

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
Facultad de Ciencias
Departamento de Biología Molecular

**TOROVIRUS PORCINO:
CARACTERIZACIÓN MOLECULAR,
DIAGNÓSTICO Y EPIDEMIOLOGÍA EN
ESPAÑA**

JAIME PIGNATELLI GARRIGÓS
Madrid, 2007

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
Facultad de Ciencias
Departamento de Biología Molecular

**TOROVIRUS PORCINO:
CARACTERIZACIÓN MOLECULAR,
DIAGNÓSTICO Y EPIDEMIOLOGÍA EN
ESPAÑA**

Memoria presentada por
Jaime Pignatelli Garrigós
para optar al grado de
Doctor en Ciencias

Madrid, 2007

El trabajo presentado en esta memoria ha sido realizado en el Departamento de Biología Molecular y Celular del Centro Nacional de Biotecnología-CSIC (CNB-CSIC), bajo la dirección de la Dra. Dolores Rodríguez Aguirre, gracias a la beca Predoctoral de Formación de Personal Investigador (FPI) BES-2003-1593, asociada al proyecto BIO2002-03739, y a la financiación además de los proyectos BIO2005-08449, BIO2006-10988 y el proyecto PORCIVIR del Programa CONSOLIDER, todos ellos financiados por el Ministerio de Educación y Ciencia (MEC).

SUMMARY

SUMMARY

Toroviruses have been described as gastroenteritis causing agents in horses, cows, pigs and humans. Although several laboratories have described a high prevalence of antibodies against torovirus in serum samples from cows and pigs, little information is still available about torovirus epidemiology. Except from an equine isolate (BEV), toroviruses cannot be grown in cultured cells and this has been a handicap for the development of specific torovirus diagnostic tools.

In this work, we present two new RT-PCR methods to detect porcine torovirus (PToV) in faecal samples. One of these methods can be useful to detect BEV, BToV and PToV in stool samples by amplification of a region from the M gene conserved in all described toroviruses. On the other hand, a seminested RT-PCR specific for PToV has been developed for virus detection in low virus containing samples. Using these methods, two new isolates of PToV were detected. PToV-BRES2 was found in a faecal sample from Italy and isolate PToV-ZAR2 was detected in a stool sample from a Spanish farm.

The newly described PToV isolate, PToV-BRES2, was phylogenetically characterized after sequencing its M, HE and N genes. Based on the HE gene sequence, PToV-BRES2 is related to P4 lineage which was previously considered to be extinguished, thus this idea should be revisited. Probably, two lineages of PToV-HE gene coexist.

The nucleocapsid (N) protein from PToV-BRES2 was produced as a recombinant product in the baculovirus system and used as antigen to develop an ELISA method that could be used to detect antibodies against PToV in pig serum samples. This method was first evaluated using serum samples collected from three different Spanish farms, and ELISA results were compared with those obtained through other serologic assays previously described to detect torovirus specific antibodies. ELISA was thus used to analyze a sera collection provided by Laboratorios HIPRA Laboratories. The results indicate a high prevalence of antibodies against PToV nucleocapsid protein in serum samples obtained from different geographical areas in Spain.

PToV-HE protein was expressed both in insect and in mammalian cells. Here we describe that HE forms oligomers mediated by disulfide bonds that may be incorporated into viral particles, as has been described to occur with the bovine coronavirus counterpart.

Finally, intestinal crypts from pig jejunum, ileum and colon were isolated and used to obtain epithelial cell cultures. These primary cell cultures were used in an attempt to adapt PToV to grow *in vitro*. Despite of an initial cytopathic effect observed in the cells upon virus inoculation, this effect was not reproduced in subsequent passages and unfortunately virus was not detected by RT-PCR nor by other techniques neither in cells nor in culture supernatants.

ÍNDICE

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. CARACTERÍSTICAS DE LOS TOROVIRUS	3
1.1. TAXONOMÍA	3
1.2. MORFOLOGÍA Y ESTRUCTURA	3
1.3. CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS	4
1.4. GENOMA DE LOS TOROVIRUS	4
1.4.1. ESTRUCTURA GENÓMICA	5
1.4.2. REPLICACIÓN Y TRANSCRIPCIÓN	6
1.4.3. FENÓMENOS DE RECOMBINACIÓN	7
1.5. PROTEÍNAS	8
1.5.1. LA REPLICASA VIRAL	9
1.5.2. LA PROTEÍNA DE LA ESPÍCULA, S	10
1.5.3. LA PROTEÍNA HEMAGLUTININA ESTERASA, HE	11
1.5.4. LA PROTEÍNA DE MEMBRANA, M	12
1.5.5. LA PROTEÍNA DE LA NUCLEOCÁPSIDA, N	12
1.6. CARACTERÍSTICAS ANTIGÉNICAS	13
1.7. MORFOGÉNESIS DE LOS TOROVIRUS	14
2. EPIDEMIOLOGÍA DE LOS TOROVIRUS	14
2.1. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA	14
2.2. CICLO EPIDEMIOLÓGICO Y TRANSMISIÓN	16
2.3. PATOGENICIDAD Y SINTOMATOLOGÍA	17
3. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO	19
OBJETIVOS	21
MATERIALES Y MÉTODOS	25
1. MUESTRAS BIOLÓGICAS	27
1.1. MUESTRAS DE HECES DE CERDO	27
1.2. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS FECALES DE CERDO	27

1.3. MUESTRAS SEROLÓGICAS DE CERDO	28
1.4. PROCESAMIENTO DE MUESTRAS SEROLÓGICAS DE CERDO	28
2. CULTIVOS BACTERIANOS	29
2.1. CEPAS	29
2.2. MEDIOS DE CULTIVO, MANTENIMIENTO, CRECIMIENTO Y CONSERVACIÓN	29
3. LÍNEAS CELULARES Y VIRUS	29
3.1. LÍNEAS CÉLULARES	29
3.2. MEDIOS DE CULTIVO, MANTENIMIENTO Y CULTIVO DE LÍNEAS CELULARES.....	30
3.3. CULTIVOS PRIMARIOS DE CÉLULAS INTESTINALES DE CERDO.....	30
3.4. VIRUS	31
4. SUEROS.....	32
5. HERRAMIENTAS BIOINFORMÁTICAS.....	33
6. MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLÉICOS	34
6.1. EXTRACCIÓN DE RNA	34
6.2. REACCIÓN DE LA TRANSCRIPTASA REVERSA (RT)	35
6.3. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	35
6.3.1. DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS	35
6.3.2. RT-PCR PARA CLONAJES	36
6.4. ANÁLISIS DE DNA MEDIANTE SEPARACIÓN ELECTROFORÉTICA Y EXTRACCIÓN DE GELES DE AGAROSA	37
6.5. MANIPULACIÓN DE DNA EN PROCESOS DE CLONACIÓN	37
6.6. PLÁSMIDOS	38
6.6.1. DERIVADOS DE pGEM T®	38
6.6.2. DERIVADOS DE pFASTBAC™HT	38
6.6.3. DERIVADOS DE pJR101	39
6.7. EXTRACCIÓN DE DNA PLASMÍDICO	39
7. MANIPULACIÓN DE CÉLULAS Y VIRUS	39
7.1. GENERACIÓN DE BACULOVIRUS RECOMBINANTES	39
7.2. GENERACIÓN DE VIRUS RECOMBINANTES DE VACCINIA	40
7.3. AMPLIFICACIÓN DE VIRUS	40

7.4. PURIFICACIÓN DE VIRUS	41
7.5. TITULACIÓN DE VIRUS POR ENSAYO DE PLACA	41
7.6. TITULACIÓN DE VIRUS POR HEMOAGLUTINACIÓN	42
7.7. ENSAYO DE ACTIVIDAD ACETILESTERASA (ANAE) EN CÉLULAS	42
7.8. ENSAYO DE HEMADSORCIÓN	42
8. MANIPULACIÓN DE PROTEÍNAS	43
8.1. ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO DE PROTEÍNAS EN SDS-PAGE.....	43
8.2. INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE <i>WESTERN BLOT</i>	43
8.3. INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS POR MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA	44
8.4. PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES POR CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD	44
8.4.1. PURIFICACIÓN MEDIANTE RESINA DE COBALTO.....	44
8.4.2. PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE INMUNOCAPTURA.....	45
8.5. ENSAYOS DE ENTRECRUZAMIENTO QUÍMICO	45
8.6. GENERACIÓN DE ANTICUERPOS	46
9. ENSAYOS DE DIAGNÓSTICO	46
9.1. INMUNOMICROSCOPIA ELECTRÓNICA	46
9.2. RT-PCR PARA DIAGNÓSTICO	47
9.2.1. RT-PCR	47
9.2.2. RT-PCR SEMIANIDADA	47
9.3. ENSAYOS SEROLÓGICOS	48
9.3.1. ENSAYO INMUNOENZIMÁTICO (ELISA)	48
9.3.2. DETECCIÓN DE ANTICUERPOS POR <i>WESTERN-BLOT</i>	48
9.3.3. ENSAYO DE NEUTRALIZACIÓN DE LA INFECTIVIDAD VIRAL	49
9.3.4. ENSAYO DE INHIBICIÓN DE LA HEMOAGLUTINACIÓN	49
RESULTADOS	51

1. DESARROLLO DE MÉTODOS MOLECULARES BASADOS EN LA RT-PCR PARA LA DETECCIÓN DE TOROVIRUS EN HECES	53
1.1. DESARROLLO DE UNA RT-PCR PARA LA DETECCIÓN DE TOROVIRUS	53
1.1.1. SELECCIÓN DE OLIGONUCLEÓTIDOS Y OPTIMIZACIÓN DE LOS MÉTODOS DE RT-PCR	53
1.1.2. COMPARACIÓN ENTRE LOS MÉTODOS DE RT-PCR PARA EL DIAGNÓSTICO DE TOROVIRUS	54
1.1.3. OPTIMIZACIÓN DE LA RT-PCR PARA LA DETECCIÓN DE TOROVIRUS EN HECES	56
1.1.4. OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE OBTENCIÓN DEL RNA VIRAL EN MUESTRAS DE HECES	57
1.2. ANÁLISIS MEDIANTE RT-PCR DE LA PRESENCIA DE TOROVIRUS EN MUESTRAS DE HECES	58
1.2.1. ANÁLISIS POR INMUNOMICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE LAS MUESTRAS DE HECES DE CERDO PROCEDENTES DE BRESCIA	62
1.3. DESARROLLO DE UNA RT-PCR SEMIANIDADA ESPECÍFICA PARA PToV	63
1.3.1. DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS Y OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE RT-PCR SEMIANIDADA	63
1.3.2. COMPARACIÓN ENTRE EL MÉTODO DE RT-PCR Y RT-PCR SEMIANIDADA EN LA DETECCIÓN DE PToV EN HECES	63
1.4. ANÁLISIS MEDIANTE RT-PCR SEMIANIDADA DE LA PRESENCIA DE PToV EN HECES DE CERDOS	64
2. ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE LOS AISLADOS DE PToV.....	66
2.1. AMPLIFICACIÓN DE LAS SECUENCIAS CODIFICANTES DE LAS PROTEÍNAS M, HE Y N DE PToV-BRES2	67
2.2. ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS SECUENCIAS CODIFICANTES DE LAS PROTEÍNAS M, HE Y N DE PToV-BRES2	68
3. EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS M, HE Y N DE PToV-BRES2	70

3.1. EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS M, HE Y N DE PTOV-BRES2 EN CÉLULAS DE INSECTO MEDIANTE RECOMBINANTES DE BACULOVIRUS.....	71
3.1.1. GENERACIÓN DE LOS BACULOVIRUS RECOMBINANTES PARA LAS PROTEÍNAS M, HE Y N DE PTOV-BRES2	71
3.1.2. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS M, HE Y N DE PTOV-BRES2 EN CÉLULAS DE INSECTO	72
3.1.2.1. EXPRESIÓN DE PTOV-M	72
3.1.2.2. EXPRESIÓN DE PTOV-HE	73
3.1.2.3. EXPRESIÓN DE PTOV-N	74
3.2. PURIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS M, HE Y N DE PTOV-BRES2.....	75
3.3. GENERACIÓN DE ANTICUERPOS FRENTE A LAS PROTEÍNAS N Y HE DE PTOV-BRES2.....	76
3.3.1. OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS FRENTE A LA PROTEÍNA N DE PTOV-BRES2	77
3.3.2. OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS FRENTE A LA PROTEÍNA HE DE PTOV-BRES2	77
3.4. EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA HE DE PTOV-BRES2 EN CÉLULAS DE MAMÍFERO MEDIANTE UN RECOMBINANTE DEL VIRUS VACCINIA.....	79
3.4.1. MODIFICACIONES POST-TRADUCCIONALES DE LA PROTEÍNA HE	79
3.4.1.1. ANÁLISIS DE LOS OLIGÓMEROS DE LA PROTEÍNA HE MEDIANTE EL TRATAMIENTO CON AGENTES DE ENTRECRUZAMIENTO QUÍMICO	82
3.4.2. DISTRIBUCIÓN SUBCELULAR DE LA PROTEÍNA HE	84
3.4.3. FUNCIONALIDAD DE LA PROTEÍNA HE.....	85
3.4.3.1. ENSAYO DE ACTIVIDAD ACETILESTERASA	85
3.4.3.2. ENSAYO DE UNIÓN A ÁCIDOS SIÁLICOS	86
3.4.4. PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA HE	88
4. DESARROLLO DE UN MÉTODO DE ELISA PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS FRENTE A PTOV EN MUESTRAS DE SUEROS	88
4.1. OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE ELISA	89

4.1.1. SELECCIÓN DEL ANTÍGENO ÓPTIMO PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS	89
4.1.2. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE TAPIZADO	90
4.1.3. OPTIMIZACIÓN DE LA CANTIDAD DE ANTÍGENO Y DILUCIÓN DE LOS SUEROS	91
4.1.4. ANÁLISIS DE LA REACTIVIDAD CRUZADA ENTRE DISTINTOS VIRUS PORCINOS	92
4.2. ANÁLISIS DE SUEROS DE CERDO PROCEDENTES DE GRANJAS ESPAÑOLAS	94
4.2.1. ANÁLISIS MEDIANTE ELISA	95
4.2.2. ANÁLISIS MEDIANTE WESTERN-BLOT	96
4.2.3. ANÁLISIS MEDIANTE NEUTRALIZACIÓN DE BEV	98
4.2.4. ANÁLISIS MEDIANTE INHIBICIÓN DE LA HEMOAGLUTINACIÓN.....	102
4.3. ANÁLISIS DE UNA SEROTECA DE SUEROS PORCINOS	104
4.4. ESTUDIO LONGITUDINAL EN SUEROS DE LECHONES	105
5. ADAPTACIÓN DE PT _o V AL CRECIMIENTO EN CULTIVO <i>IN VITRO</i>	109
DISCUSIÓN	113
1. DESARROLLO DE MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR	115
2. DESARROLLO DE SISTEMAS DE DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO.....	118
3. COMPARACIÓN ENTRE LOS MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR Y SEROLÓGICO PARA PT _o V.....	123
4. EVOLUCIÓN FILOGENÉTICA DE LOS TOROVIRUS	125
5. ANÁLISIS DE LA PROTEÍNA HE DE PT _o V-BRES2	126
6. ADAPTACIÓN AL CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE PT _o V	129

CONCLUSIONES

131

BIBLIOGRAFÍA

135

ABREVIATURAS

143

INTRODUCCIÓN

1. CARACTERÍSTICAS DE LOS TOROVIRUS

1.1. TAXONOMÍA.

En abril de 1992, el grupo de estudio de los coronavirus sugirió incluir los torovirus dentro de la familia *Coronaviridae* como un género aparte. Dicha sugerencia fue aceptada por el Comité de Taxonomía de Virus y ratificada en el IX Congreso Internacional de Virología, en 1993. Dicha organización taxonómica respondía a las similitudes morfológicas y estructurales entre los dos grupos de virus, así como a la semejanza en la organización genética y en la estrategia de replicación (Cavanagh y col., 1993; Cavanagh y Horzinek, 1993; 1994). Según esto, la familia *Coronaviridae* contiene dos géneros, *Coronavirus* y *Torovirus* y junto con las familias *Arteriviridae* y *Roniviridae* constituyen el orden Nidovirales. Sin embargo, recientemente, en base a análisis comparativos de secuencia, se ha sugerido la reorganización de los géneros *Coronavirus* y *Torovirus* como dos subfamilias dentro de la familia *Coronaviridae* o como dos familias independientes del orden Nidovirales (Gonzalez y col., 2003). También se ha propuesto la inclusión de una tercera familia de virus que infectan peces, denominados bafinivirus (Schutze y col., 2006).

Hasta el momento se han identificado cuatro especies de torovirus: el torovirus equino (EToV), originalmente llamado virus Berne (BEV); el torovirus bovino (BToV), originalmente llamado virus Breda (BRV); el torovirus humano (HToV) (Beards y col., 1986; Jamieson y col., 1998) y el torovirus porcino (PToV) (Scott y col., 1987; Kroneman y col., 1998). A excepción de BEV, los torovirus no han sido adaptados al crecimiento en cultivo *in vitro*. Por ello, BEV es el torovirus más estudiado, y hasta hace dos años era el aislado más caracterizado a nivel genético. Sin embargo, recientemente se ha publicado la secuencia completa del aislado original BRV de BToV (Draker y col., 2005).

1.2. MORFOLOGÍA Y ESTRUCTURA.

Los torovirus son virus con envuelta constituidos por una nucleocápsida aparentemente hueca de simetría helicoidal de unos 104 nm de longitud y 2,3 nm de diámetro y una periodicidad de 4,5 nm. Esta nucleocápsida está constituida por la proteína N y el RNA viral. La envuelta viral está constituida por una membrana lipídica de 11 nm de grosor en la que se encuentra insertada la proteína M. Las proteínas S y HE constituyen las dos coronas de espículas de 20 nm y 8-9 nm de longitud, respectivamente (Weiss y col., 1983; Cornelissen y col., 1997), presentes en el exterior de la partícula viral.

La nucleocápsida posee cierta flexibilidad lo que le permite adoptar, además de una forma alargada (Figura 1, abajo), una forma toroidal más o menos abierta (Figura 1, arriba), que dio el nombre de torovirus a este grupo de virus. La flexibilidad de la nucleocápsida y su relación con la membrana hace que las partículas virales de torovirus muestren cierto pleomorfismo pudiendo observarse por microscopía electrónica formas alargadas de 35x170 nm, arriñonadas o de disco bicóncavo de un diámetro de 120-140 nm (Horzinek y col., 1987; Horzinek y col., 1987).

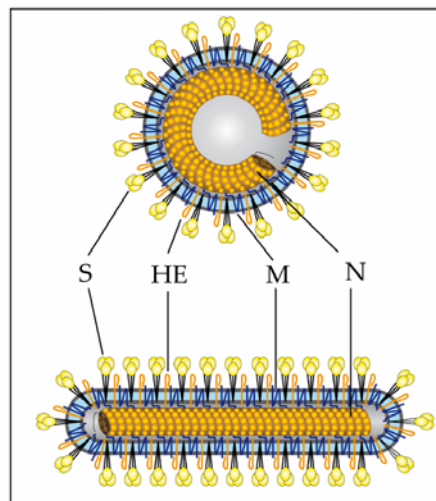


Figura 1. Modelo morfológico de la partícula viral de torovirus

1.3. CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS.

Los torovirus, como otros virus con envuelta lipídica, son sensibles a tratamientos con cloroformo o dietileter. Estos tratamientos provocan la pérdida absoluta de la infectividad del virus. Sin embargo, al igual que otros virus entéricos, son muy resistentes a proteasas y al pH del tracto intestinal, así BEV mantiene su estabilidad e infectividad en un rango de pH entre 2,5 y 10,3 (Weiss y Horzinek, 1986). Los tratamientos con fosfolipasa C, tripsina y quimiotripsina no disminuyen la infectividad de BEV, de hecho, los dos últimos aumentan la infectividad del virus *in vitro*.

La estabilidad térmica de BEV es menor que la de algunos coronavirus. El virus pierde su capacidad infectiva de forma gradual si se conserva entre 31 y 45°C. Tanto BEV como BToV mantienen su morfología y capacidad hemoaglutinante durante 10 días, si se mantienen entre 18-20°C. A temperaturas por encima de 4°C el virus pierde infectividad en 24-48 horas en el caso de mantenerse en muestras fecales, y tras 2-3 semanas en el caso de virus purificado. A temperaturas entre -20 y -70°C (Koopmans y col., 1986), el virus se degrada aunque a un ritmo muy inferior. Las congelaciones y descongelaciones afectan también al mantenimiento de la estructura viral, observándose pérdida de las espículas y desintegración de la partícula viral (Koopmans y Horzinek, 1994).

1.4. GENOMA DE LOS TOROVIRUS

El genoma de los torovirus consta de una única molécula de RNA de cadena sencilla y de polaridad positiva de 28-30Kb de longitud, y posee una estructura cap en su extremo 5' y una cola de adeninas en su extremo 3' (Figura 2).

1.4.1. ESTRUCTURA GENÓMICA

La estructura del genoma de los torovirus, tanto en lo que respecta al orden de algunos de sus genes como de las secuencias no codificantes, es compartida por otros virus del orden Nidovirales. El RNA genómico de los torovirus consta de dos regiones no traducidas (NTR) en los extremos 5' y 3' de 840 y 200 nucleótidos (nt), respectivamente. Estas regiones NTR contienen las secuencias necesarias para la síntesis de las cadenas positivas y negativas del RNA genómico y de los RNAs subgenómicos, además de las señales de empaquetamiento del RNA (Smits y col., 1991).

El RNA genómico de los torovirus contiene 6 marcos de lectura abierta (ORF). Las dos primeras ORFs, denominadas ORF1a y ORF1b, ocupan dos tercios del genoma y solapan en una región de 12 nt. La posición de estas dos ORFs se conserva en todos los virus del orden Nidovirales y en ellas están codificadas las proteínas de la replicasa viral. El tercio restante del genoma contiene las ORFs 2, 3, 4 y 5, que codifican las proteínas estructurales del virus, S, M, HE y N (Snijder y col., 1988).

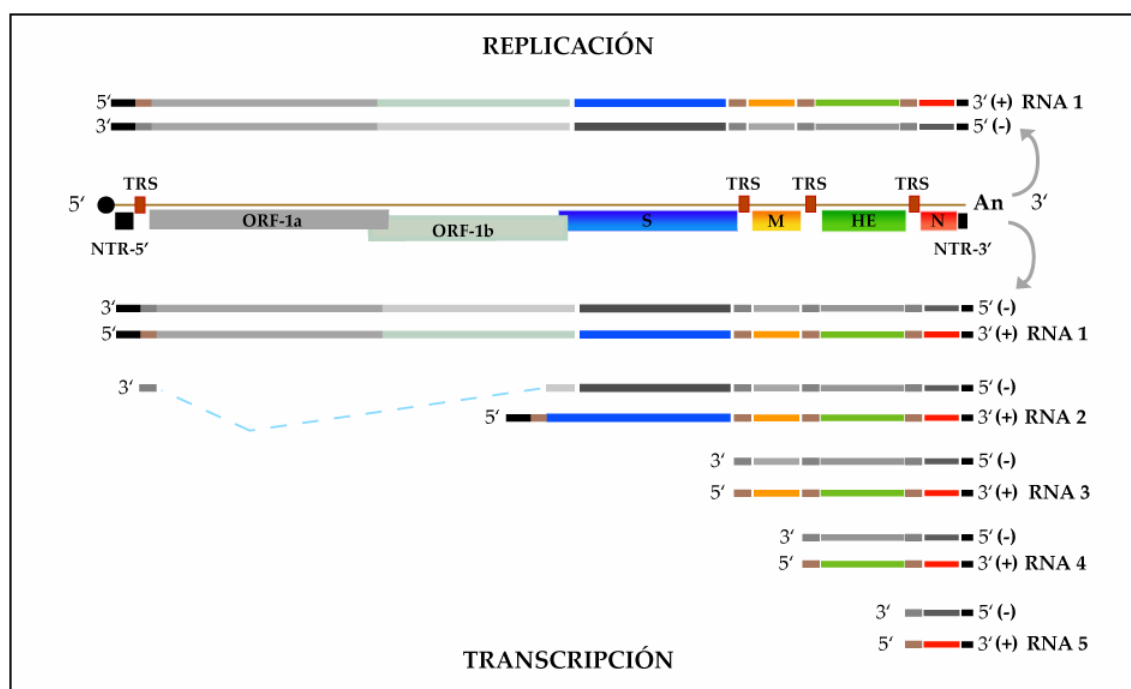


Figura 2. Replicación y transcripción de los torovirus

Las ORFs 3, 4 y 5 están precedidas por regiones intergénicas cuya secuencia consenso es 5'-AC-N₂₋₃-UGUUUAGA-3' y que se denominan secuencias reguladoras de la transcripción (TRS). Estas secuencias están conservadas entre todos los torovirus aunque las secuencias flanqueantes de las TRSs y la distancia al inicio de la ORF pueden variar entre las distintas especies (Snijder y col., 1988; Snijder y col., 1990). La secuencia 5'-AC-3' así como la región rica en purinas 5'-

UGUUUAGA-3' son esenciales para la regulación de la transcripción del RNA, de hecho, mutaciones en alguno de estos nucleótidos causan la inhibición de la transcripción. Sin embargo, la distancia entre estas dos secuencias no es esencial aunque sí afecta al nivel de transcripción (Smits y col., 2005).

1.4.2. REPLICACIÓN Y TRANSCRIPCIÓN.

Todos los nidovirus, incluidos los torovirus, se caracterizan por expresar sus genes a partir de RNAs subgenómicos (RNAsg) 3' coterminales, con estructura cap en el extremo 5' y poliadenilados en el extremo 3'. Estos RNAsg, a pesar de ser estructuralmente policistrónicos, actúan como unidades de transcripción monocistrónicas, de forma que sólo el gen en la posición 5' es traducido y da lugar a una proteína (Snijder y col., 1990).

Durante la replicación de los torovirus en las células infectadas se generan, a partir del RNA genómico del virus, 4 moléculas de RNA de 7.000, 2.000, 1.200 y 800 pb de longitud, denominadas RNAs subgenómicos (RNAsg). Estos RNAsg, actuarán como RNAs mensajeros para la síntesis de las proteínas S, M, HE (Cornelissen y col., 1997) y N. En el caso de BEV, el gen HE está parcialmente deletado (HEX) por lo que el RNAsg que se genera tiene una longitud inferior y su producto aún no ha sido descrito en células infectadas por el virus (Snijder y col., 1988). Hasta el momento se han descrito tres mecanismos para la síntesis de los RNAsg dentro del orden Nidovirales. Los coronavirus y los arterivirus utilizan un mecanismo de síntesis discontinua que permite la generación de RNAsg 5' coterminales mediante la copia en cada RNAsg de una secuencia del extremo 5' del RNA genómico, denominada secuencia líder. El cambio de molde se produce durante la síntesis de la cadena negativa del RNAsg. Las secuencias TRS adyacentes al gen atenúan la síntesis del RNA permitiendo que el complejo replicasa-RNA naciente se libere del RNA molde, para unirse de nuevo en la secuencia TRS presente en el extremo 5' del genoma, y que continúe la síntesis copiando la secuencia líder adyacente a esta TRS (Pasternak y col., 2006). Los ronivirus utilizan un mecanismo de síntesis continua, mediante el cual se generan RNAsg 3' coterminales que carecen de secuencia líder en su extremo 5' (Cowley y col., 2002).

Los torovirus utilizan un mecanismo de transcripción único dentro de los nidovirus. Para la síntesis de los RNAsg 3, 4 y 5 los torovirus utilizan un mecanismo continuo, análogo al utilizado por los ronivirus. Las secuencias TRS situadas en posición 5' y adyacentes a cada ORF actúan como señales de parada durante la síntesis de la cadena negativa y como promotores de la síntesis de la cadena positiva del RNAsg (Figura 2). Para la síntesis del RNAsg 2, sin embargo, utilizan un mecanismo discontinuo (van Vliet y col., 2002; Smits y col., 2005) en el cual

la síntesis de la cadena negativa se atenuaría al llegar a una región con estructura secundaria de lazo dentro de la ORF1b y se produciría un cambio de molde al extremo 5' del RNA genómico mediado por homología de secuencia, donde continuaría la síntesis de la TRS allí presente (Figura 2). Este mecanismo discontinuo es único para torovirus ya que ni en coronavirus ni en arterivirus se han encontrado estructuras secundarias adyacentes a sus TRS. La razón por la que los torovirus mantienen esta forma de replicación es motivo de controversia. Se especula si es un vestigio de un mecanismo ancestral de transcripción o si este mecanismo confiere alguna ventaja biológica al virus (van Vliet y col., 2002; Pasternak y col., 2006).

1.4.3. FENÓMENOS DE RECOMBINACIÓN.

Dentro del orden Nidovirales se han descrito fenómenos de recombinación en arterivirus y coronavirus. En los torovirus se han descrito dos grandes fenómenos de recombinación interespecie. Uno implicaría una recombinación entre PToV y BToV y un segundo fenómeno se habría dado entre éstos y un torovirus no identificado (Smits y col., 2003).

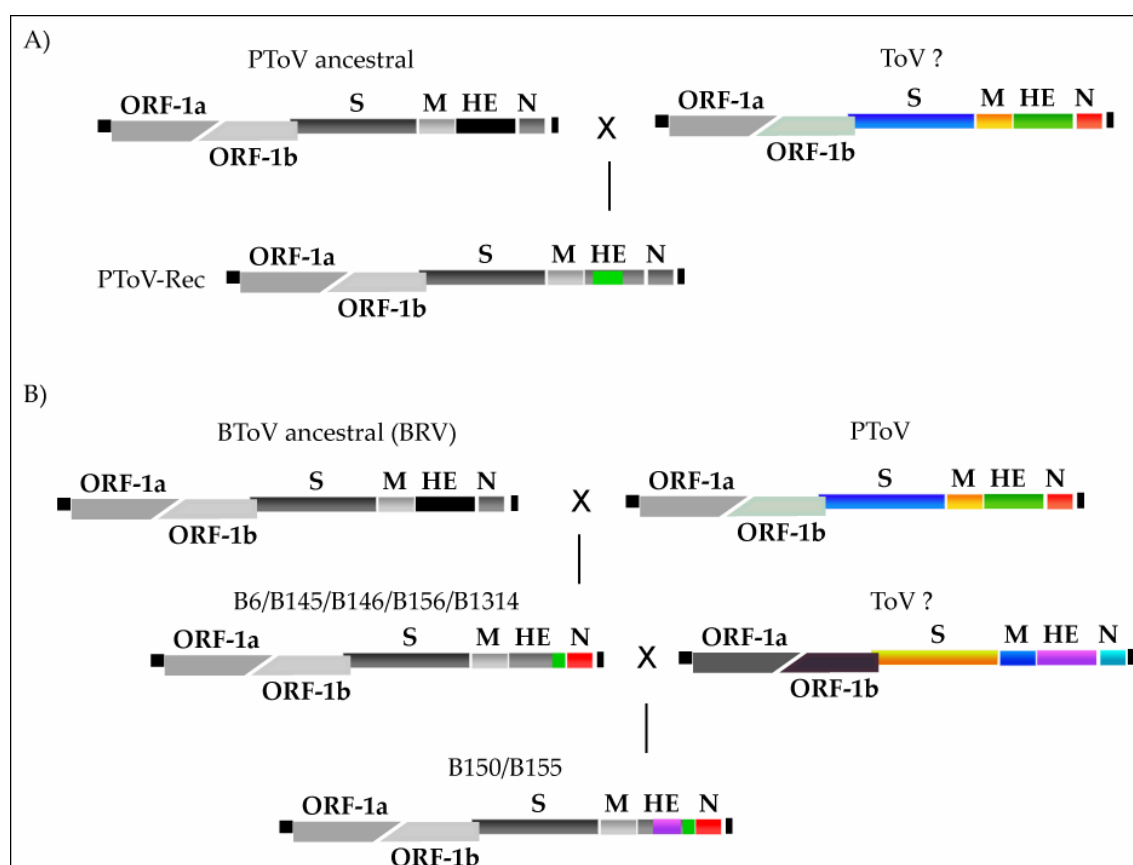


Figura 3. Fenómenos de recombinación durante la evolución de A) PToV y B) BToV (Smits y col., 2003)

Mediante el análisis bioinformático de las secuencias de las cepas de campo de PToV y BToV, se observó que respecto a los genes S y M, todos los torovirus de una especie quedan en

un mismo grupo. Sin embargo, al comparar las secuencias de los genes HE y N se observan divergencias evolutivas entre las distintas cepas. Las secuencias del gen N de las cepas de campo de BToV aisladas en Europa no quedan agrupadas con la secuencia del gen N del aislado tipo, Breda (BRV), sino con las de PToV. Por otra parte, en cuanto al gen HE de BToV, las secuencias de las cepas B150 y B155, divergen de las obtenidas para otros aislados de BToV. Algo semejante ocurre para los aislados porcinos, donde la secuencia del gen HE del aislado porcino P4 difiere de las secuencias del resto de aislados porcinos en un porcentaje similar al que divergen las secuencias de HE de las cepas B-150 y B-155 con el resto de los aislados bovinos.

Mediante herramientas bioinformáticas se ha demostrado que durante la evolución de PToV se produjo un fenómeno de recombinación en la región intermedia del gen HE con un virus desconocido, que condujo a la divergencia en los dos linajes de torovirus porcino conocidos, de los cuales sus secuencias modelo son las de los aislados P4 y Markelo. No existen datos sobre cual sería la cepa parental, pero se presupone que es la cepa P4 pues es la más antigua y no se ha encontrado ningún aislado moderno con la misma secuencia (Smits y col., 2003).

Por otro lado, durante la evolución de BToV se produjo un fenómeno de recombinación interespecie en el que un BToV tipo BRV adquirió el extremo 3' del gen HE y el gen N completo de un aislado de PToV. Este primer fenómeno habría dado lugar a los aislados "modernos" de torovirus bovino B6, B145, B156 y B1314. Posteriormente, un virus de este nuevo linaje recombinaría nuevamente con un torovirus no identificado adquiriendo la región intermedia del gen HE, dando lugar a un nuevo linaje representado por los aislados los linajes B150 y B155.

1.5. PROTEÍNAS

Mediante marcajes metabólicos de células infectadas con BEV se observó la expresión de las proteínas estructurales S, M y N (Horzinek y col., 1985; Weiss y Horzinek, 1986). Posteriormente, mediante el marcaje en superficie de partículas purificadas de BToV se observó una proteína de 65 kDa correspondiente a la proteína HE (Koopmans y col., 1986; Cornelissen y col., 1997), que no se observa en BEV ya que en este virus el gen está truncado. Además de las proteínas estructurales, los torovirus aportan su propia maquinaria de replicación, constituida por proteasas, la polimerasa y proteínas de modificación de RNA (Snijder y col., 1990), que se expresan a partir del RNA genómico, como un paso previo al inicio de la replicación/transcripción viral.

1.5.1. LA REPLICASA VIRAL.

Los torovirus, al igual que otros nidovirus, expresan las proteínas de la maquinaria de replicación a partir de poliproteínas. Las poliproteínas de torovirus, pp1a y pp1ab, se traducen a partir del RNA genómico. La poliproteína pp1a se expresa a partir de la ORF 1a y la poliproteína pp1ab se expresa mediante un cambio de fase de lectura en la región solapante entre la ORF1a y la ORF1b, propiciado por una secuencia “resbaladiza” seguida por un pseudonudo de RNA. La eficiencia de este cambio de fase de lectura es del 20-30% (Snijder y col., 1990).

1.5.1.1. La poliproteína pp1a.

La poliproteína pp1a de torovirus tiene un tamaño de 4455 aminoácidos. Mediante la comparación de secuencia con otros virus del orden Nidovirales en ella se han identificado hasta el momento 4 proteínas y 3 dominios hidrofóbicos (Figura 4):

- Adenosina difosfato ribosa 1''-fosfatasa (ADRP): Situada en el extremo N-terminal de la poliproteína (Figura 4). La ADRP cataliza la hidrólisis del grupo fosfato de la enzima adenosina difosfato ribosa 1''-fosfato implicada en la ruta de procesamiento de los RNA celulares. Esta enzima sólo se ha descrito en coronavirus y torovirus pero no en otros Nidovirales.

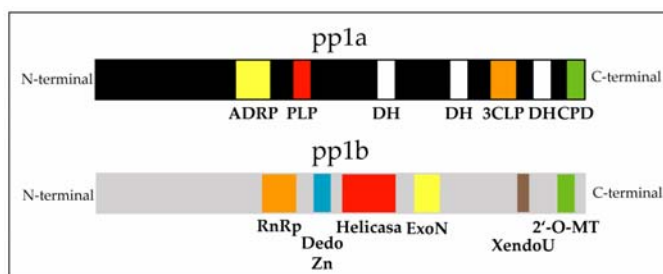


Figura 4. Regiones con funciones conocidas de pp1a y pp1ab de torovirus. Para simplificar la figura se representa sólo la región de pp1b de la poliproteína pp1ab.

- Proteasa tipo papaina (PLP): La PLP (Figura 4) ha sido descrita en coronavirus y en arterivirus, sin embargo, no está presente en ronivirus (Cowley y Walker, 2002). La PLP de torovirus posee la estructura de una proteasa tipo papaina, es decir, dos dominios $\alpha+\beta$ y una cisteína como residuo catalítico acompañada de una histidina (Ziebuhr y col., 2000). La PLP tiene capacidad autoproteolítica y es la responsable de la liberación del extremo N-terminal de la pp1a mediante un corte proteolítico (Smits y col., 2006).

- Proteasa tipo 3C (3CLP): Es la principal proteasa de los torovirus así como del resto de los nidovirus. Se encuentra en el extremo C-terminal de pp1a (Figura 4). Tiene similitud con la proteasa 3C de picornavirus (Ziebuhr y col., 2000), aunque entre las distintas familias de nidovirus hay diferencias en cuanto al residuo catalítico. En coronavirus y ronivirus el residuo catalítico es una cisteína de un doblete Cys-His. Este centro catalítico no es habitual en este tipo de proteína cuyo centro catalítico suele ser His-Asp(Glu)-Cys. Las proteasas 3CLP de los torovirus y de los arterivirus poseen como residuo catalítico una serina dentro de la triada His-Asp-Ser, y dos dominios tipo barril β . Por lo tanto, estas proteasas son parecidas a la quimiotripsina (Snijder y col., 1996), y se las refiere como Serinproteasa tipo 3C.
- Fosfodiesterasa cíclica (CPD): En los coronavirus MHV (virus de la hepatitis murina) y HCoV-293E (coronavirus humano 293E) y en los torovirus BToV y BEV se ha descrito una secuencia en el extremo C-terminal de pp1a que se ha identificado como una posible proteína con actividad fosfodiesterasa cíclica (Snijder y col., 2003).
- Dominios hidrofóbicos (DH): Los dominios hidrofóbicos son regiones conservadas entre todos los torovirus y en idénticas posiciones (Figura 4). Se cree que estos dominios podrían dirigir el complejo de la replicasa viral hacia regiones membranosas del interior celular donde se ha sugerido que tendría lugar la replicación del RNA viral (Smits y col., 2006).

1.5.1.2. La poliproteína pp1ab.

La poliproteína pp1ab contiene las proteínas virales implicadas en la replicación y la modificación post-transcripcional del RNA viral (Figura 4). Así, pp1ab daría lugar a la RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp), una proteína que contiene un dedo de zinc de unión a ácidos nucleicos, una helicasa (Snijder y col., 1990) y tres proteínas de modificación de RNA: exonucleasa 3'-5' (ExoN), endoribonucleasa específica de poli-U (XendoU) y ribosa 2'-O-metiltransferasa dependiente de S-adenosinmetionina (2'-O-MT) (Draker y col., 2005). Hay que destacar que los dominios de la RdRp y de la helicasa están conservados en un 50% respecto al coronavirus MHV, y que el orden de estos dominios en torovirus y en coronavirus está invertido respecto a otros virus RNA de cadena positiva. El dominio 2'-O-MT es único para coronavirus y torovirus (Snijder y col., 1990).

1.5.2. LA PROTEÍNA DE LA ESPÍCULA, S

La proteína S es una glicoproteína de membrana de tipo I y constituye la corona de espículas grandes en la partícula viral. Se traduce a partir del RNAsg 2 como un precursor de

aproximadamente 200 kDa que sufre un corte proteolítico post-traducciona en una secuencia reconocida por proteasas tipo tripsina, dando lugar a dos subunidades de 100 y 75 kDa (Weiss y Horzinek, 1986). Además, la subunidad de 100 kDa posee dos dominios con siete repeticiones que estabilizan la interacción de tipo lazo-lazo entre las dos subunidades. Se ha sugerido que otras interacciones tipo lazo-lazo podrían darse también de forma intermolecular para constituir los dímeros de proteína (Snijder y col., 1990).

La proteína S es la responsable de la unión al receptor celular y de la iniciación de la infección y posee además actividad hemoaglutinante. La proteína S de BEV aglutina eritrocitos de conejo y humanos del grupo O. En ensayos de hemoaglutinación con virus BToV purificado se ha visto que éste es capaz de aglutinar eritrocitos de rata a 37°C, pero es incapaz de aglutinar eritrocitos humanos o de conejo (Woode y col., 1982; Koopmans y col., 1986). Por otra parte no hay información acerca de la capacidad hemoaglutinante de PToV.

1.5.3. LA PROTEÍNA HEMAGLUTININA ESTERASA, HE.

La proteína HE de torovirus se expresa a partir del RNAsg 4 y constituye las espículas pequeñas de las partículas virales de BToV. En BEV el gen HE está truncado y aún no se ha identificado el producto proteico correspondiente. La proteína HE es una glicoproteína de membrana de clase I de 65 kDa con una homología de secuencia del 30% con la proteína HEF de influenza C y con la proteína HE de los coronavirus del grupo II (Cornelissen y col., 1997). Estas proteínas han sido descritas

como enzimas destructoras de receptores y conservan un dominio catalítico F-G-D-S con actividad acetilesterasa específica para ácidos Sialato-9-O-acetilneuramínico, así como un dominio de unión a un receptor y un dominio de integración en membrana. La predicción de estructura de estas tres proteínas indica ciertas similitudes ya que entre ellas se conservan muchos de los residuos de cisteína que forman puentes disulfuro intramoleculares y que configuran su estructura secundaria (de Groot, 2006) (Figura 5).

La función biológica de la proteína HE en el ciclo vital de los torovirus no está clara, ya que no es una proteína esencial para la replicación del virus, al menos *in vitro*, como demuestra el

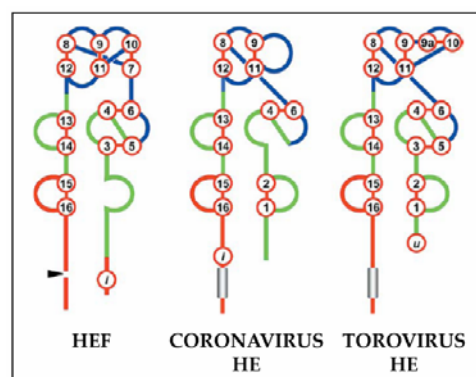


Figura 5 Modelo estructural de las proteínas hemaglutinina esterasa de influenza C (HEF), coronavirus (HE) y torovirus (HE) (de Groot, 2006).

hecho de que BEV perdiera esta proteína durante su adaptación al cultivo *in vitro* (Cornelissen y col., 1997). El modelo actual propone que la proteína HE es la encargada de degradar la mucosidad que reviste el epitelio intestinal para permitir la unión del virus al receptor celular. En este sentido hay que destacar que las proteínas HE de torovirus porcino y bovino, muestran preferencia por tipos distintos de ácidos siálicos. La proteína HE de torovirus porcino degrada preferentemente ácidos siálicos monoacetilados presentes en el mucus del tracto intestinal, mientras que la proteína HE de BToV degrada ácidos siálicos diacetilados presentes en forma de cadenas de glicosilación en proteínas, y también, aunque en menor medida, ácidos siálicos mono-acetilados (Smits y col., 2005). Otra posible función para la proteína HE de torovirus, es que compita con la proteína S por el receptor celular y destruya aquellos receptores a los que se une. De esta forma la infección o no de una célula dependerá del balance entre las actividades de ambas proteínas (Smits y col., 2005). Este sistema de competición permitiría la selección de la célula diana de forma parecida a como ocurre con las proteínas neuroaminidasa y hemoaglutinina de los virus Influenza A y B.

1.5.4. LA PROTEÍNA DE MEMBRANA, M.

La proteína M de torovirus se expresa a partir del RNAsg 3 y tiene un peso molecular de 27 kDa, sin embargo, su elevada hidrofobicidad hace que en geles SDS-PAGE su movilidad electroforética corresponda a la de una proteína de 22 kDa. Se ha propuesto un modelo estructural de la proteína M, en el que los extremos N-terminal y C-terminal quedarían expuestos al exterior y el interior de la partícula, respectivamente. Los análisis computacionales de la secuencia de la proteína revelan que posee tres hélices α en la mitad N-terminal, por lo que se la considera una proteína de membrana de clase III. Este modelo lo comparte con la proteína M de coronavirus (Den Boon y col., 1991).

La proteína M es esencial para el ensamblaje de las partículas virales que tiene lugar en los compartimentos membranosos de la célula (Den Boon y col., 1991). En células infectadas con BEV, la proteína M se acumula preferentemente en el compartimento intermedio (Garzón y col., 2006).

1.5.5. LA PROTEÍNA DE LA NUCLEOCÁPSIDA, N.

La proteína N de torovirus se expresa a partir del RNAsg 5 y es la más abundante en la partícula viral (84% de la masa proteica del virus) (Horzinek y col., 1985). Es una proteína de 20 kDa que está fosforilada, como ocurre en coronavirus. La proteína N posee dos regiones de aminoácidos básicos. En el extremo N-terminal posee 15 argininas en una región de 47 aminoácidos, y en el C-terminal posee otros 7 aminoácidos básicos. Ambas regiones estarían

próximas en el espacio y constituirían un dominio de unión al RNA (Horzinek y col., 1985). Según el modelo actual la proteína N sería la responsable de la estabilización del RNA genómico y, junto a él, constituiría la nucleocápsida de la partícula viral.

1.6. CARACTERÍSTICAS ANTIGÉNICAS.

En BToV se han descrito dos serotipos (BToV-1 y BToV-2) (Woode y col., 1985). A pesar de que ambos muestran antígenos comunes, anticuerpos frente a uno de los serotipos no inhiben la aglutinación mediada por el otro serotipo, y por otra parte, la inoculación con un virus de un serotipo no genera protección frente a virus del otro serotipo (Hoet y Saif, 2004).

A pesar de los serotipos descritos para BToV, los torovirus de las distintas especies muestran antígenos comunes y reactividades cruzadas en algunos determinantes antigénicos (Weiss y col., 1983). El principal antígeno donde se observa reactividad cruzada es la proteína de la espícula S. Sueros frente a BToV, HToV y PToV, neutralizan la infectividad de BEV *in vitro* (Weiss y col., 1983; Beards y col., 1986; Brown y col., 1987; Kroneman y col., 1998). Igualmente se observa esta reactividad cruzada con BEV en ensayos de inmunoprecipitación (Horzinek y col., 1985), de inhibición de la hemoaglutinación y de inmunomicroscopía electrónica (Beards y col., 1986).

La proteína de la nucleocápsida N es la que presenta mayor reactividad cruzada con anticuerpos frente a torovirus de otras especies. Esto es algo habitual en proteínas internas y muy conservadas que no sufren presión selectiva por parte del sistema inmune del huesped (Horzinek y col., 1985).

La proteína HE de los torovirus BToV, HToV y PToV ha sido la menos estudiada en cuanto a antigenicidad. En BToV, se ha observado que anticuerpos frente al virus tipo BRV inmunocapturan la proteína HE del linaje B145, pero no del linaje B150 (ver 6.3). En el caso de PToV, aún no se ha estudiado si existen también diferencias antigénicas entre los dos linajes de PToV (Smits y col., 2005).

Respecto a otros virus causantes de infecciones entéricas no se ha observado reactividad cruzada mediante inhibición de hemoaglutinación, neutralización de la infectividad o inmunomicroscopía electrónica de los torovirus con coronavirus, rotavirus o parvovirus (Beards y col., 1986).

1.7. MORFOGÉNESIS DE LOS TOROVIRUS.

La morfogénesis de los torovirus se ha estudiado mediante microscopía electrónica en células infectadas con BEV (Weiss y Horzinek, 1986) y en células intestinales de terneras gnobioticas infectadas con BToV (Fagerland y col., 1986).

En células infectadas con BEV entre las 7 y las 9 horas postinfección (hpi) se observan agregados polisomales en las cercanías de la cara citoplasmática de los compartimentos membranosos, incluida la membrana nuclear. A partir de las 10 hpi se pueden observar en el citoplasma estructuras tubulares que corresponden a las nucleocápsidas así como viriones, en su mayoría con forma baciliforme y un tamaño de 120 nm, y que en ocasiones aparecen embebidas en el interior de vesículas secretoras. Las nucleocápsidas previamente formadas en el citoplasma adquieren la membrana en el compartimento intermedio. Las nucleocápsidas con membrana ofrecen mayor densidad electrónica lo que sugiere la interacción de la proteína de la nucleocápsida con alguna otra proteína, posiblemente la proteína M (Weiss y Horzinek, 1986).

A las 10 hpi, se observan algunas partículas en el exterior de la célula aunque la máxima liberación de virus al medio se produce a las 24 hpi. La liberación de virus se produce a través de la vía exocítica celular, mediante vesículas de fusión con la membrana plasmática. En células intestinales y a tiempos largos de infección también se observan partículas virales liberadas tras la lisis celular. Se ha sugerido que el virus podría utilizar la vía normal de exocitosis a tiempos cortos de infección, antes de 10 hpi y una vía citolítica a tiempos largos de infección (Fagerland y col., 1986). Como se ha mencionado anteriormente, en el interior de las células infectadas con BEV, el 90% de las partículas virales presentan una forma alargada, aunque también se observan algunas partículas con morfología ovoidal y esférica. Sin embargo, en el medio extracelular se pueden observar tanto partículas alargadas o toroidales y esféricas o discoidales en igual proporción. (Weiss y Horzinek, 1986).

En el caso de BToV a tiempos tardíos de infección se observan partículas arriñonadas (30-120 nm) y esféricas (75-90 nm) con dos coronas de espículas de 8-10 nm y 17-24 nm de longitud en la superficie del epitelio intestinal (Pohlenz y col., 1984; Fagerland y col., 1986).

2. EPIDEMIOLOGÍA DE LOS TOROVIRUS

Los torovirus han sido descritos como patógenos causantes de gastroenteritis en caballos, vacas, cerdos y humanos. También se han detectado anticuerpos contra torovirus en cabras,

ovejas y otros ungulados, por lo que se les considera ampliamente distribuidos en los animales superiores.

2.1. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA.

La información epidemiológica acerca de los torovirus es muy escasa, sin embargo los estudios realizados reflejan una amplia dispersión geográfica de estos virus.

El torovirus equino se ha estudiado en Suiza, Francia, Estados Unidos (Weiss y col., 1984), Alemania (Liebermann, 1990) e India (Brown y col., 1988), utilizando para ello ensayos de ELISA y de neutralización de la infección viral de BEV. En todos estos lugares la prevalencia de anticuerpos frente a torovirus en sueros de caballos fue del 35%.

El torovirus bovino ha sido el más estudiado en cuanto a epidemiología, tanto en lo que se refiere al análisis de prevalencia de anticuerpos como en la detección del virus. Se describió por primera vez en 1982 en Breda (Iowa) (Woode y col., 1982) y hasta el momento se ha estudiado en Canadá (Durham y col., 1989), Estados Unidos (Van Kruiningen y col., 1992), Francia (Lamouliatte y col., 1987), Reino Unido (Brown y col., 1987), Alemania (Liebler y col., 1992), Austria (Haschek y col., 2006), Holanda (Koopmans y col., 1991), Hungría (Matiz y col., 2002), Japón (Ito y col., 2007), Corea (Park y col., 2007), Sudáfrica (Vorster y Gerdes, 1993), Venezuela (Hoet y col., 2003) y Costa Rica (Perez y col., 1998). Los datos aportados por estos estudios reflejan una alta prevalencia de anticuerpos, entorno al 75-94% (Koopmans y col., 1989; Liebler y col., 1992), tanto en individuos recién nacidos como en adultos, mientras que la prevalencia del virus fue del 5-10% en animales jóvenes asintomáticos y del 35-50% en casos de diarreas graves en individuos recién nacidos (Duckmanton y col., 1998).

El torovirus humano fue descrito por primera vez en 1986 como patógeno humano relacionado morfológica y antigénicamente con BToV y BEV (Beards y col., 1986). La presencia de HToV se ha estudiado en Estados Unidos (Koopmans y col., 1993), Canadá (Duckmanton y col., 1997; Jamieson y col., 1998), Brasil (Koopmans y col., 1997) e India (Krishnan y Naik, 1997). En un trabajo llevado a cabo en Fortaleza (Brasil) se demostró la presencia de HToV en el 20-30% de los casos de niños con gastroenteritis aguda o persistente (Koopmans y col., 1997). En un estudio realizado en Canadá con individuos adultos hospitalizados por procesos gastrointestinales se detectó HToV en el 35% de los casos y se observó que la presencia de HToV era más frecuente en individuos inmunodeprimidos (Jamieson y col., 1998).

De los torovirus descritos hasta el momento, el torovirus porcino es el menos estudiado en cuanto a su epidemiología se refiere. Fue descrito por primera vez en 1987 en el Reino Unido tras el análisis por microscopía electrónica de muestras de heces de lechones con gastroenteritis

(Scott y col., 1987) y posteriormente también por microscopía electrónica, se identificaron partículas de torovirus en heces de lechones con diarrea en Canadá (Durham y col., 1989). Por otra parte, ya anteriormente se habían detectado anticuerpos frente a torovirus en sueros de cerdo en Sudáfrica (Penrith y Gerdes, 1992) y en Suiza (Weiss y col., 1984), donde el 81% de los animales del estudio presentaban anticuerpos neutralizantes frente a BEV. Sin embargo, hasta 1998 no se demostró formalmente la existencia de torovirus porcino (Kroneman y col., 1998). En un estudio llevado a cabo en lechones de una granja de Bélgica y 10 granjas de Holanda, más del 80% de los cerdos adultos presentaban anticuerpos neutralizantes frente a BEV y 8 de los 9 lechones analizados fueron positivos para torovirus por RT-PCR y microscopía electrónica (Kroneman y col., 1998). En Hungría se llevó a cabo un estudio en 10 granjas de cerdos y en este estudio 10 de 200 lechones fueron positivos para torovirus por RT-PCR. Estos 10 lechones pertenecían a dos granjas distintas (Matiz y col., 2002). Además PToV, también ha sido detectado en Holanda e Italia (Smits y col., 2003).

Todos estos datos demuestran que los torovirus están ampliamente distribuidos entre los animales superiores y en los distintos continentes.

2.2. CICLO EPIDEMIOLÓGICO Y TRANSMISIÓN.

La información disponible acerca de la transmisión y del ciclo epidemiológico del torovirus porcino en granjas es escasa. El trabajo realizado por Kroneman y colaboradores en diez granjas de cerdos en Holanda (Kroneman y col., 1998), indica que los lechones se infectan a los pocos días del destete una vez que los títulos de anticuerpos maternos descienden. La liberación de virus en las heces es detectable entre los 3 y 10 días después del destete. La infección temprana de los animales indica que el virus es endémico por lo que debe de haber una presencia continua de cerdos infectados y de lechones susceptibles de ser infectados.

Se ha llegado a conclusiones similares en estudios llevados a cabo con BToV en granjas de ganado bovino (Woode y col., 1982; Durham y col., 1989; Koopmans y col., 1991; Hoet y col., 2003). Estos estudios han permitido desarrollar un modelo de ciclo epidemiológico para BToV (Hoet y Saif, 2004). La infección por BToV suele ocurrir entre los 2 y 5 días de vida del recién nacido, pero puede producirse hasta los 4 meses. El grado de infección depende de la protección adquirida a través del calostro de la madre. Así, los animales que no han recibido calostro o bien éste no poseía anticuerpos suficientes, son altamente susceptibles de ser infectados durante el primer mes de vida, desarrollando diarrea entre moderada y severa, y liberando altos niveles de virus en las heces. Si el animal sobrevive desarrollará una respuesta inmune activa. En cambio, si el recién nacido recibe anticuerpos maternos a través del calostro

estará parcialmente protegido contra la enfermedad y no desarrollará diarrea o ésta será de carácter leve. Aún así, podría liberar virus en baja cantidad y no es seguro que desarrolle una respuesta inmune activa. En ambos casos, tras la primera infección los animales pueden seguir liberando virus de forma intermitente, lo que constituye la principal fuente de virus.

Cuando los animales alcanzan la edad adulta (5 ó 7 meses en el caso de las terneras) suelen trasladarse a otra zona de la granja donde se agrupan con otros animales adultos. En este momento se repite el escenario anterior. La infección o no de los animales dependerá de si el animal ha desarrollado una respuesta inmune activa o no. En este sentido es importante recalcar que la protección de los anticuerpos maternos en terneras desaparece entre los 2 y los 6 meses de edad. Además, se ha sugerido que los animales jóvenes que han sufrido infección por BToV podrían no desarrollar una respuesta inmune activa, o que ésta sea débil, debido a la interferencia de los anticuerpos maternos, o bien, a que el virus ataca las células M del epitelio intestinal, responsables de la respuesta inmune en la mucosa intestinal (Koopmans y col., 1989). Así, los animales jóvenes seronegativos o con un nivel de anticuerpos bajos serían susceptibles a la infección por BToV (Koopmans y col., 1989; Hoet y col., 2002). Mientras que, los animales seropositivos estarían aparentemente protegidos frente a una nueva infección y no liberarían virus.

La transmisión de torovirus ocurre por vía oral-fecal como prueban las infecciones experimentales de terneras mediante la administración oral de heces contaminadas con BToV (Woode y col., 1982; Woode y col., 1984; Woode y col., 1985). Además para BToV, también se ha sugerido una posible vía nasal, por la detección de material genético de BToV en secreciones nasales (Hoet y col., 2002), pero esto no se ha estudiado en otros torovirus.

2.3. PATOGENICIDAD Y SINTOMATOLOGÍA.

Durante la infección con torovirus, tanto en células infectadas con BEV, como en las células del epitelio intestinal de terneras infectadas con BToV se observan estructuras tubulares de longitud, diámetro y densidad electrónica variable en el citoplasma y en el núcleo a partir de las 10 hpi. La existencia de estas estructuras en el núcleo podría sugerir, bien una fase nuclear del virus o una situación de daño celular (Horzinek y col., 1985). Además, en células infectadas con BEV se han observado procesos degenerativos del núcleo y de las mitocondrias a partir de las 10 hpi, sugiriendo que los torovirus causarían daño celular tras, al menos, un ciclo replicativo cuando ya se hubieran formado viriones en el interior de la célula (Weiss y Horzinek, 1986).

La información sobre el efecto macroscópico de la patogenicidad de los torovirus se ha obtenido a partir de las infecciones experimentales de terneras utilizando BToV.

En infecciones experimentales, los primeros síntomas de diarrea aparecen al cabo de 24-48 hpi. El virus infecta rápidamente las células epiteliales de la parte baja de las vellosidades y de las criptas intestinales en el yeyuno medio, ileon y colon (Pohlenz y col., 1984; Woode y col., 1984; Fagerland y col., 1986). En algunos casos, se ha detectado la presencia de BToV en las células M y en las células "Dome" de las placas de Peyer, encargadas de la respuesta inmune en las mucosas del intestino (Pohlenz y col., 1984; Woode y col., 1984). Se ha sugerido que las criptas del epitelio serían las células diana del virus y que siguiendo el proceso natural de maduración de la célula, se convertirían en células de las vellosidades infectadas (Woode y col., 1982; Koopmans y Horzinek, 1994).

El efecto citopático producido por BToV sobre el epitelio intestinal incluye degeneración vacuolar de los enterocitos, necrosis y exfoliación del epitelio lo que conlleva la atrofia de las vellosidades, hiperplasia de las criptas y en algunos casos fusión de vellosidades (Woode y col., 1982; Pohlenz y col., 1984; Woode y col., 1984; Fagerland y col., 1986; Koopmans y Horzinek, 1994).

En cuanto a la sintomatología de la infección por torovirus, los procesos de diarrea aguda son los más evidentes. Las heces muestran una apariencia amarillo-verdosa y consistencia líquida. Otros síntomas de enfermedad son fiebre y deshidratación. Sólo en casos muy graves se produce la muerte del individuo entre las 48-96 hpi. El mecanismo por el cuál los torovirus causan diarrea es desconocido aunque se ha sugerido que el daño necrótico focalizado en el epitelio intestinal, así como el daño en las vellosidades y en las criptas intestinales, conducen a una pérdida de la capacidad de absorción de agua dando lugar a un proceso de diarrea que dura entre 2-6 días. La larga duración del proceso de diarrea se atribuye a la destrucción de las células de la cripta encargadas de la regeneración del epitelio intestinal. Hasta el momento no existe información acerca de la patogénesis de BToV en las mucosas respiratorias.

En infecciones experimentales con combinaciones de otros virus entéricos y BToV se observó un fenómeno aditivo en la inducción de diarrea (Woode y col., 1984; Woode y col., 1985).

En infecciones de campo, los animales mostraron profundas diarreas amarillentas o blanquecinas, de aspecto semisólido o líquido y síntomas de deshidratación. En algunos casos también mostraron otros síntomas como pérdida de peso, fiebre y depresión. La liberación de virus bajo condiciones de campo puede variar considerablemente en cuanto a título de virus y a la ventana temporal de la liberación del virus, por lo que el porcentaje de casos en los que se detecta la presencia de BToV en heces en infecciones naturales es bajo (Woode, 1987).

3. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

En la literatura se han descrito gran variedad de técnicas de diagnóstico para la detección de antígenos virales en muestras biológicas. Estas técnicas son fundamentales, para el diagnóstico clínico y para el desarrollo de estudios epidemiológicos que permitan conocer la frecuencia de una enfermedad en una población, su posible impacto socio-económico, así como, para el diseño de estrategias preventivas para controlarla.

Las técnicas de diagnóstico en virología se pueden clasificar en función del componente que detectan. Así, las técnicas de diagnóstico molecular están basadas en la amplificación específica de ácidos nucleicos virales por PCR, RT-PCR, o PCR en tiempo real, o en la detección de RNA o DNA viral mediante sondas de DNA específicas marcadas. Un segundo grupo de técnicas son las basadas en la detección de antígenos virales o de anticuerpos frente a un virus mediante reacciones antígeno-anticuerpo (diagnóstico serológico), entre las que se encuentran los ensayos inmunoenzimáticos (ELISA), el *immunoblotting*, los ensayos de neutralización de la infectividad viral y de inhibición de la hemoaglutinación. Finalmente, la presencia de partículas virales en una muestra también puede detectarse mediante la observación del propio virus por microscopía electrónica o mediante ensayos biológicos como el crecimiento del virus en sistemas celulares y la hemoaglutinación (diagnóstico virológico).

El análisis de la presencia de anticuerpos frente a un virus en individuos de una población aporta información acerca de la frecuencia de infección, de los grupos de edad de la población más expuestos y de los factores de riesgo de infección, así como de la distribución geográfica del virus. Esta información es vital para la vigilancia y control de la dispersión de un virus y para el diseño de estrategias preventivas. Además, técnicas como la neutralización de la infectividad viral aportan información acerca del estado de protección de una población frente a un virus o de la efectividad de una vacuna.

El desarrollo de técnicas de diagnóstico para torovirus se ha visto ralentizado ya que, a excepción de BEV, los torovirus no han sido adaptados al crecimiento en cultivo *in vitro*. El método de diagnóstico más utilizado hasta ahora para la detección de torovirus en muestras de heces es la microscopía electrónica (Lamouliatte y col., 1987; Scott y col., 1987; Durham y col., 1989; Liebler y col., 1992; Penrith y Gerdes, 1992; Vorster y Gerdes, 1993; Krishnan y Naik, 1997; Duckmanton y col., 1998; Perez y col., 1998). También se ha descrito la detección por RT-PCR (Duckmanton y col., 1997; Duckmanton y col., 1998; Kroneman y col., 1998; Hoet y col., 2002; Matiz y col., 2002; Hoet y col., 2003; Hoet y col., 2003; Ito y col., 2007) y mediante ensayos de ELISA (Weiss y col., 1984; Woode, 1987; Liebler y col., 1992; Koopmans y col., 1993). La Dra. Saif y sus colaboradores compararon estas tres técnicas en el caso concreto de la detección de BToV

en muestras de heces (Hoet y col., 2003). En dicho trabajo se describen el ELISA y la RT-PCR como las técnicas más sensibles y específicas, sin embargo, también describieron alteraciones en los resultados debido a la compleja composición de las heces, que reduciría la especificidad del ensayo de ELISA, y a la presencia de inhibidores de polimerasas en las heces que reducirían la sensibilidad de la RT-PCR (Wilson, 1997). Por otra parte, la microscopía electrónica se describe como un método de diagnóstico poco específico debido al pleomorfismo de las partículas virales de torovirus y a la semejanza con las partículas de coronavirus. La utilización de anticuerpos específicos frente a torovirus (inmunomicroscopía electrónica) mejora la especificidad de la técnica. Aún así, la microscopía electrónica es una técnica laboriosa y de baja sensibilidad.

Los estudios de prevalencia de anticuerpos frente a torovirus se han realizado mediante ensayos de neutralización de la infectividad, inhibición de la hemoaglutinación, ELISA e *immunoblotting* (Weiss y col., 1984; Beards y col., 1986; Brown y col., 1988; Chirnside y col., 1995); (Weiss y col., 1984; Brown y col., 1987; Koopmans y col., 1989; Van Kruiningen y col., 1992; Kroneman y col., 1998).

OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo fue desarrollar herramientas biotecnológicas que permitan el inicio tanto de estudios epidemiológicos como de biología molecular básica acerca de los torovirus, una familia de virus de la que actualmente apenas se dispone de información, pero cuyos miembros se encuentran muy presentes en explotaciones ganaderas. Por ello, nos planteamos como objetivos concretos:

1. Establecer sistemas de diagnóstico específicos para la detección molecular de torovirus porcino en muestras de heces mediante métodos de RT-PCR.
2. Generar virus recombinantes de baculovirus y del virus vaccinia para la expresión heteróloga de las proteínas de torovirus porcino.
3. Obtención de antígenos de torovirus porcino para la generación de sueros específicos contra estos en animales de laboratorio.
4. Establecer sistemas de diagnóstico serológico para la detección de anticuerpos frente a torovirus porcino en muestras de sueros de cerdos.
5. Estudiar la prevalencia de anticuerpos frente a torovirus porcino en en una muestra representativa de las zonas productoras de ganado porcino en España.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MUESTRAS BIOLÓGICAS

Las muestras biológicas de sueros y heces de cerdo se recibieron en el laboratorio, procedentes de diferentes granjas. A su llegada se rellenó un formulario en el que se indica la fecha de entrada, una breve historia de las muestras, el procesamiento que se les dio según el tipo de muestra. Además se les asignó un código en el que se indicaba el tipo animal al que correspondía (P, en el caso de porcino y B, en el caso de Bovino), seguido de las tres primeras letras del lugar de procedencia y un número correlativo en función del número de muestras recibidas del mismo lugar.

1.1.MUESTRAS DE HECES DE CERDO

Recibimos en el laboratorio muestras de diarrea de quince lechones procedentes de distintas granjas españolas de cerdos. Cuatro de estas muestras procedían de una granja de Lérida (P-LER) y correspondían a lechones con menos de un día de vida. Tres muestras correspondían a lechones lactantes con diarrea que procedían de una granja de Barcelona (P-BAR) en la que previamente se había controlado un brote de clostridiosis y rotavirus. Procedentes de una granja de Valencia (P-VAL) se recibieron cuatro muestras de diarrea de lechones de entre 1 y 6 días de vida. El 85% de los lechones sufría diarrea severa y se había descartado una patología bacteriana. Finalmente, se recibieron cuatro muestras de diarrea de lechones de una granja de Zaragoza (P-ZAR) en la que el 100% de los lechones estaban afectados, con una mortalidad del 5%, y en la que se había descartado la presencia de rotavirus, coronavirus y *Escherichia Coli* (*E. Coli*).

Además de muestras de granjas españolas, el Dr Lavazza, del *Istituto Zooprofilattico della Lombardia ed Emilia* (Brescia, Italia) nos remitió cinco muestras de heces, tres de las cuales correspondían a heces de cerdo (P-BRES) y dos a heces de teneras (B-BRES). En las cinco muestras se había diagnosticado por microscopía electrónica la presencia de partículas virales de torovirus, además de coronavirus y rotavirus.

1.2.PROCESAMIENTO Y ALMACENAJE DE MUESTRAS DE HECES DE CERDO

Las muestras fecales de cerdo se recibieron en diferentes formatos, por lo que según el formato se les dio un tratamiento específico:

- **Hisopos rectales con medio agar.** Utilizados generalmente para análisis bacteriológicos. Se retiraron los escobillones, se sumergieron en solución salina con fosfato (PBS) estéril y se lavaron mediante agitación. El material fecal que quedó en el

medio con agar se recuperó añadiendo 1ml de PBS estéril y sometiéndolo a agitación. Posteriormente se recogió procurando no arrastrar agar durante el proceso.

- **Hisopos en medio Hanks** (Vircell, SL): Las muestras recibidas en este formato se homogenizaron en el mismo contenedor mediante agitación y se retiró el escobillón.
- **Muestras de heces:** se diluyeron en una relación 1:1 en PBS y se homogenizaron mediante agitación. En algunos casos se añadió un volumen más de PBS para mejorar la homogenización.

Una vez las muestras habían sido homogenizadas el material sólido se descartó mediante centrifugación a 9000 rpm durante 15 minutos. El sobrenadante se repartió en alícuotas de 200µl para análisis por RT-PCR y 50µl para análisis por microscopía electrónica y se conservaron a -80 °C.

1.3.MUESTRAS SEROLÓGICAS DE CERDO

Se recibieron sueros procedentes de tres granjas españolas, 15 sueros de lechones procedentes de una granja de Galicia, 10 sueros de cerdas adultas de una granja de Navarra y 20 sueros de cerdas adultas procedentes de una granja de Aragón, de la cual también nos habían enviado muestras de heces (ver apartado 1.1 de materiales y métodos).

Los estudios de seroprevalencia se han realizado en dos serotecas de sueros de cerdo. Para los estudios en la población de cerdos adultos se utilizó una seroteca de 600 sueros de cerdas de distintas edades y explotaciones ganaderas de Aragón, Castilla y León, Cataluña y Murcia, cedida por los Laboratorios HIPRA (Gerona) (Maldonado y col., 2006).

Para los estudios serológicos longitudinales se utilizó una seroteca de 680 sueros de 160 lechones y de 40 madres de 4 granjas de Cataluña cedida por el Dr. Joaquín Segalés del *Centre de Recerca en Sanitat Animal* (CRESA), en Barcelona. En cada granja se seleccionaron diez camadas distintas de madres de distintas edades y de cada camada se recogieron los sueros de 4 lechones entre las semanas 1, 3, 7, 11 y 15 de vida. Además, se tomaron muestras de suero de las madres junto con la primera muestra de suero de los lechones.

1.4.PROCESAMIENTO DE MUESTRAS SEROLÓGICAS DE CERDO

Las muestras de sueros de cerdos procedentes de las granjas se recibieron bien congeladas o a 4 °C. Las muestras se repartieron en alícuotas de 100µl, cuando se dispuso de suficiente volumen. Una de las alícuotas de cada suero se descomplementó mediante una incubación durante 30 minutos a 56 °C y a continuación se almacenó a -20 °C. El resto de alícuotas así como las muestras de sueros restantes se congelaron a -80°C.

2. CULTIVOS BACTERIANOS

2.1. CEPAS

La cepa bacteriana de *E. coli* DH5 α (F⁻, recA1, hsdR17, (rK⁻,mK⁻), LacZY, argF, U169, supE44, thi1, gyrA96, relA1) (Hanahan, 1983) se utilizó para la clonación, crecimiento y purificación de los distintos plásmidos empleados en este trabajo.

Para la generación de los baculovirus recombinantes se utilizó la cepa de *E. coli* DH10Bac que procede de la cepa DH5 α , pero que ha sido transformada con un b́acmido *lacZ*-mini-*att*Tn7, para facilitar la generación de baculovirus recombinantes por recombinación homóloga y que contiene además un plásmido en el que están codificadas las proteínas mediadoras de la recombinación.

2.2. MEDIOS DE CULTIVO, MANTENIMIENTO, CRECIMIENTO Y CONSERVACIÓN

Para el crecimiento de *E. coli* en medio líquido se utilizó el medio de cultivo Luria Broth (LB) (Sambrook y col., 2001) suplementado con ampicilina (100 μ g/ml). Para el cultivo en placa de las bacterias se añadió al medio LB Bacto-Agar (Difco®) al 1,5% y ampicilina (100 μ g/ml).

Los clones bacterianos se conservaron a -80 °C en medio LB con 15% de glicerol como crioprotector.

3. LÍNEAS CELULARES Y VIRUS

3.1. LÍNEAS CÉLULARES

En este trabajo se han utilizado las siguientes líneas celulares para el cultivo *in vitro* de virus:

- **E. Derm (NBL-6)** (ATCC® CCL-57™): Células de piel de caballo.
- **MA104 clon 1** (ATCC® CRL-2378.1™): Células epiteliales de riñón de mono verde.
- **ST** (ATCC® CRL-1746™): Fibroblastos de testículo de cerdo.
- **BSC40** (ATCC® CRL-2761™): Células epiteliales de riñón de mono verde. Es una línea derivada de la BS-C-1 con la peculiaridad de que soporta el cultivo a 40 °C.
- **HeLa** (ATCC® CCL-2™): Células epiteliales humanas de adenocarcinoma de cuello uterino.
- **HighFive** (Invitrogen, corp): Células epiteliales de *Trichoplusia ni*.

3.2. MEDIOS DE CULTIVO, MANTENIMIENTO Y CULTIVO DE LÍNEAS CELULARES

Las distintas líneas celulares de mamífero se cultivaron en medio mínimo Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (GIBCO®) (Dulbecco y Freeman, 1959) suplementado con 100U/ml de penicilina, 100U/ml de estreptomycin, 0,5µg/ml fungizona(GIBCO®), 50µg/ml de gentamicina (Sigma) y aminoácidos no esenciales (Sigma). Además, se añadió suero fetal bovino (FCS) a una concentración del 15% en el caso de la línea celular E. Derm y del 10% para las líneas ST y MA104. En el caso de la línea BSC40 se añadió suero de ternera recién nacida (NCS) al 10%. Todas las líneas celulares de mamífero se cultivaron a 37 °C, con 5% de CO₂ y 98% de humedad.

La línea celular de insecto *High Five* se cultivó en medio TC-100 suplementado con penicilina (100 U/mL), estreptomycin (100 µg/mL), gentamicina (50 µg/mL), fungizona (0,5 µg/mL), una mezcla de antimicrobianos (0,001%) y un 10% de FCS. Las células se mantuvieron a 28 °C.

Todas las líneas celulares se conservaron en nitrógeno líquido en medio de congelación compuesto por 85% de FCS y 15% de dimetilsulfóxido (DMSO) como crioprotector.

3.3. CULTIVOS PRIMARIOS DE CÉLULAS INTESTINALES DE CERDO

Las criptas intestinales de cerdo se obtuvieron a partir de explantes de intestino. Para su obtención se utilizó un método descrito previamente (Rusu y col., 2005). Los tramos de intestino se obtuvieron a partir un cerdo adulto, que iba a ser sacrificado para otros experimentos ajenos a nuestro laboratorio. Se recogieron 3 fragmentos de unos 15 cm correspondientes a tramos de yeyuno, ileon y colon, se sumergieron en PBS frío y se mantuvieron en hielo. A continuación se lavaron los tramos en primer lugar con PBS libre de calcio y magnesio a 37 °C y después con PBS suplementado con antibióticos y antimicrobianos al 1%, glucosa 2,7 mg/ml y L-glutamina 4 mM.

A continuación, los tramos de intestino se rellenaron con una solución de PBS con dithiotreitol (DTT) 1mM, se cerraron los extremos con pinzas quirúrgicas y se sumergieron en PBS durante 5 minutos a 37 °C en agitación. Tras el tratamiento, se retiró la solución de DTT y se reemplazó por una solución de PBS completo con collagenasa (300 U/ml) y dispasa (0,1 mg/ml). De nuevo se cerraron los extremos del tramo de intestino y se incubaron 20 minutos a 37 °C sumergidos en PBS. Tras el tratamiento, se descartó la solución de digestión que contenía principalmente células muertas y el mucus.

Para la extracción de las células del epitelio intestinal, se abrieron longitudinalmente los tramos y con ayuda de un portaobjetos de cristal estéril se raspó la superficie luminal de los

tramos, hasta alcanzar el tejido endotelial. Para disgregar el material obtenido mediante el raspado del tejido, éste se incubó en PBS con dispasa 1mg/ml, y se pasó a través de una aguja de 23G con ayuda de una jeringuilla, y se recogieron las células mediante centrifugación a 140 g durante 3 minutos.

Para separar las criptas intestinales de las células individualizadas (epiteliales y fibroblastos) las células se resuspendieron en 30 ml de una solución de sorbitol al 2% en medio DMEM y se centrifugaron durante 3 minutos a 50 g. Este proceso se repitió cinco veces, descartando cada vez el sobrenadante. Las células intestinales obtenidas se resuspendieron en medio DMEM con 10% FCS y se sembraron en botellas de 75 cm² para que se adhirieran los fibroblastos remanentes y así separarlos de las criptas que quedan en suspensión. Tras una incubación de una hora a 37 °C, el material no unido a la botella se recuperó y las células se recogieron mediante centrifugación a 140g durante 3 minutos. Las células se resuspendieron en medio de cultivo para criptas (DMEM, glucosa 25mM, hidrocortisona 100nM, triiodotironina 20nM, hormona de crecimiento epidérmica (EGF) 1ng/ml, insulina 1µg/ml, ácido linoleico-albúmina 10µg/ml, glutamax al 1%, aminoácidos no esenciales, 100U/ml de penicilina, 100U/ml de estreptomicina, 0,5µg/ml de fungizona (Gibco), 50µg/ml de gentamicina (Sigma) y FCS al 10%. Las células se sembraron en botellas de cultivo tapizadas con colágeno I (1µg/cm²) y se mantuvieron a 37 °C con 5% de CO₂. Para subcultivarlas, se levantaron las células con una solución de tripsina al 0,25% y EDTA al 2% y se resuspendieron en medio cultivo para criptas, se centrifugaron a 140g 5 minutos y se resuspendieron de nuevo en medio de cultivo fresco. Los pases se realizaron a una dilución 1:2 o 1:3.

3.4. VIRUS

Los virus empleados en este trabajo han sido:

- **BEV:** Torovirus equino, cepa Berne. Es el único aislado de torovirus adaptado al cultivo *in vitro*. Cedido por el Dr. Raoul De Groot (Utrecht University. Utrecht, Holanda).
- **TEGV:** Virus de la gastroenteritis transmisible de cerdo. Cedido por el Dr. Luis Enjuanes (Centro Nacional de Biotecnología, Madrid).
- **PRRSV:** Virus del síndrome reproductivo y respiratorio de cerdo. Cedido por el Dr. Luis Enjuanes (Centro Nacional de Biotecnología, Madrid).
- **Vaccinia WR:** Virus vaccinia, cepa *Western Reserve*.
- **rVV-Luc:** Virus vaccinia recombinante que expresa el gen de la luciferasa de la luciérnaga *Photinus pyralis* (Rodríguez y col., 1988). Cedido por el Dr. Mariano Esteban (Centro Nacional de Biotecnología, Madrid).

Además en este trabajo se han generado los siguientes virus recombinantes:

- **rVV-PToV-HE:** virus vaccinia recombinante que expresa la proteína hemaglutinina esterasa, HE, de PToV-BRES2.
- **rBac-PToV-N:** Baculovirus recombinante que expresa la proteína de la nucleocápsida, N de PToV-BRES2.
- **rBac-PToV-M:** Baculovirus recombinante que expresa la proteína de membrana, M de PToV-BRES2.
- **rBac-PToV-HE:** Baculovirus recombinante que expresa la proteína hemaglutinina esterasa, HE, de PToV-BRES2.

4. SUEROS

En este trabajo se han utilizado los siguientes sueros:

- **Anti-BRES:** Suero de cerdo cedido por el Dr. Antonio Lavazza (*Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna*, Brescia, Italia).
- **SEROTEC:** Mezcla de sueros de cerdos adultos procedentes del Reino Unido de la casa comercial SEROTEC® (Serotec®, Ltd.).
- **Anti-BEV:** Suero policlonal de ratón hiperinmune para BEV.
- **Anti-PRCV:** Suero de un cerdo libre de patógenos (spf) inoculado con el coronavirus respiratorio de cerdo (PRCV). Cedido por el Dr Steven Van Gucht (Gent University, Belgica).
- **Anti-PRRSV:** Suero de un cerdo spf inoculado con el virus del síndrome respiratorio reproductivo de cerdo (PRRSV). Cedido por el Dr Steven Van Gucht (Gent University, Belgica).
- **Spf. 2.10, 2.11, 2.15 y 2.14:** Sueros de cerdos spf cedidos por el Dr Steven Van Gucht (Gent University, Belgica).
- **Anti-PToV-N:** Suero de un conejo (cepa New Zeland) inoculado con la proteína N recombinante de PToV-BRES2, producida mediante el sistema de expresión de baculovirus.
- **Anti-BEV-M_{Nt}:** Suero de un conejo (cepa New Zeland) inoculado con el péptido sintético M_{Nt} de la región N-terminal de la proteína M de BEV (aminoácidos 2-13).
- **Anti-HEpept:** Suero de un conejo (cepa New Zeland) inoculado con una mezcla de los péptidos sintéticos 286E1 y 286F1, correspondientes a los aminoácidos 50-60 y 150-160 de la proteína HE de PToV, respectivamente. Los péptidos se generaron y se acoplaron a KLH (*Keyhole Limpet Hemocyanin*) en el servicio de proteómica del Centro Nacional de Biotecnología.

- **Anti-HE286E1:** Suero de ratas inoculadas con el péptido sintético 286E1 de la proteína HE.
- **Anti-HE286F1:** Suero de ratas inoculadas con el péptido sintético 286F1 de la proteína HE.

5. HERRAMIENTAS BIOINFORMÁTICAS

El paquete informático Lasergen (DNASTar, Inc) se utilizó en este trabajo para el tratamiento y análisis bioinformático de las secuencias de DNA. A continuación se describen los programas de este paquete informático.

- **EDITseq:** La edición de las secuencias de DNA se realizó utilizando este programa. En la tabla 1 se muestran las secuencias disponibles en la base de datos del NCBI que se han utilizado en este trabajo.
- **SeqMan:** Se utilizó para el análisis de los cromatogramas de secuenciación.
- **PrimerSelect:** El diseño de oligonucleótidos basado en una secuencia determinada se llevó a cabo utilizando esta aplicación.
- **MegAlign:** Esta aplicación se utilizó para el alineamiento múltiple de secuencias aplicando el método ClustalW (Thompson *y col.* 1994). La homología entre dos secuencias se calculó a partir de un porcentaje de identidad. El análisis de las secuencias se llevó a cabo mediante árboles filogenéticos, en los que la distancia evolutiva entre las secuencias queda reflejada como número de sustituciones. De forma rutinaria, las secuencias obtenidas en el laboratorio se alinearon en primer lugar con las secuencias de la base de datos del NCBI. Si el resultado de este enfrentamiento indicaba que la secuencia pertenecía a los torovirus, entonces se procedía a los análisis de relaciones evolutivas respecto a otros torovirus cuyas secuencias están disponibles (Tabla 1), utilizando matrices de distancias y árboles filogenéticos.
- **Protean:** Esta aplicación permite la predicción de estructuras secundarias y características físico-químicas de proteínas mediante la aplicación de diferentes algoritmos bioinformáticos. Esta herramienta se utilizó para el diseño de péptidos inmunogénicos según el índice de antigenicidad (Jameson y Wolf, 1988) y de probabilidad de superficie (Emini *y col.* 1985).

Número de Acceso	Secuencia	Cepa
Y10866	Virus Breda gen HE	
X52374	Virus Berne mRNA, polimerase	
X52505	Berne Virus mRNA, proteína de la envuelta	
AJ575389	Torovirus bovino, gen N, proteína de la nucleocápsida	cepa B6
AJ575388	Torovirus bovino, gen N, proteína de la nucleocápsida	cepa B145
AJ575387	Torovirus bovino, gen N, proteína de la nucleocápsida	cepa B150
AJ575386	Torovirus bovino, gen N, proteína de la nucleocápsida	cepa B155
AJ575385	Torovirus bovino, gen N, proteína de la nucleocápsida	cepa B156
AJ575384	Torovirus bovino, gen N, proteína de la nucleocápsida	cepa B1314
AJ575382	Torovirus bovino, gen HE, proteína hemagglutinina esterasa	cepa B156
AJ575381	Torovirus bovino, gen HE, proteína hemagglutinina esterasa	cepa B155
AJ575380	Torovirus bovino, gen HE, proteína hemagglutinina esterasa	cepa B150
AJ575379	Torovirus bovino, gen HE, proteína hemagglutinina esterasa	cepa B145
AJ575378	Torovirus bovino, gen HE, proteína hemagglutinina esterasa	cepa B6
AJ575377	Torovirus bovino, gen M, proteína de membrana	cepa B155
AJ575376	Torovirus bovino, gen M, proteína de membrana	cepa B150
AJ575375	Torovirus bovino, gen M, proteína de membrana	cepa B145
AJ575374	Torovirus bovino, gen M, proteína de membrana	cepa B6
AJ575373	Torovirus bovino, gen S, proteína de la espícula	cepa B145
AJ575372	Torovirus porcino, gen S, proteína de la espícula	cepa Markelo
AJ575371	Torovirus porcino, gen M, proteína de membrana	cepa P10
AJ575370	Torovirus porcino, gen M, proteína de membrana	cepa P9
AJ575369	Torovirus porcino, gen M, proteína de membrana	cepa P4
AJ575368	Torovirus porcino, gen M, proteína de membrana	cepa Markelo
AJ575367	Torovirus porcino, gen HE, proteína hemagglutinina esterasa	cepa P78
AJ575366	Torovirus porcino, gen HE, proteína hemagglutinina esterasa	cepa P10
AJ575365	Torovirus porcino, gen HE, proteína hemagglutinina esterasa	cepa P9
AJ575364	Torovirus porcino, gen HE, proteína hemagglutinina esterasa	cepa P4
AJ575363	Torovirus porcino, gen HE, proteína hemagglutinina esterasa	cepa Markelo
AJ575362	Torovirus porcino, gen N, proteína de la nucleocápsida	cepa P78
AJ575361	Torovirus porcino, gen N, proteína de la nucleocápsida	cepa P10
AJ575360	Torovirus porcino, gen N, proteína de la nucleocápsida	cepa P9
AJ575359	Torovirus porcino, gen N, proteína de la nucleocápsida	cepa P4
AJ575358	Torovirus porcino, gen N, proteína de la nucleocápsida	cepa Markelo
AF159585	Human torovirus, mRNA hemagglutinina esterasa	
U50390	Virus Breda, mRNA RNA-RNA polimerasa (1b)	
X52506	Virus Berne mRNA, proteína de la espícula	

Tabla 1 Secuencias genómicas de torovirus disponibles en la base de datos del NCBI y utilizadas en este trabajo.

6. MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLÉICOS

6.1. EXTRACCIÓN DE RNA.

En este trabajo se han utilizado los *kits* de extracción de RNA *QIAamp® viral RNA extraction kit* (Quiagen) y *High pure RNA isolation Kit* (Roche Applied Science). En ambos casos se siguieron las instrucciones del fabricante. Se utilizaron 200µl de muestra de heces o de cultivos de virus y el RNA se recuperó en 60µl de agua libre de RNasas y DNasas provisto por el fabricante. El RNA obtenido se conservó a -80 °C.

La extracción y manipulación de RNA se llevó a cabo utilizando materiales y reactivos libres de RNasas y dedicados exclusivamente a estos procedimientos, y en un ambiente aislado del resto del laboratorio.

6.2. REACCIÓN DE LA TRANSCRIPTASA REVERSA (RT).

Las reacciones de la transcriptasa reversa (RT) se llevaron a cabo utilizando el sistema SuperScriptII (Invitrogen, Corp) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se añadieron 8 µl de RNA a una mezcla de 10 pmoles de desoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs) (Roche Applied Science) y 200 ng de hexámeros aleatorios (Roche Applied Science). La mezcla se incubó durante 5 minutos a 65 °C y 1 minuto en hielo. A continuación se añadieron 9 µl de una mezcla de reacción RT que contenía Tris HCl 50 mM, pH 8,3; KCl 75 mM, MgCl₂ 7,5mM; DTT 10mM y 40U de inhibidor de ribonucleasas (Fermentas). Se incubó esta mezcla 2 minutos a 42 °C y se añadieron 200U (1 µl) de transcriptasa reversa SuperScriptII (Invitrogen, corp) y se incubó de nuevo 50 minutos a 42 °C. Transcurrido este tiempo la enzima se inactivó mediante una incubación a 75 °C, 15 minutos. El cDNA obtenido se almacenó a -20 °C.

Todo el proceso se llevó a cabo en instalaciones separadas de la extracción de RNA, con pipetas y puntas con filtro dedicadas exclusivamente a este procedimiento.

6.3. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).

En este trabajo se describe la utilización de la reacción en cadena de la polimerasa para el diagnóstico de torovirus (apartado 9.1), así como para el clonaje de los genes estructurales de PToV.

6.3.1. DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS.

Los oligonucleótidos se diseñaron en regiones conservadas del genoma de todos los torovirus o de PToV según se indique.

La amplificación de los genes que codifican las proteínas estructurales de PToV para su posterior clonaje se llevó a cabo utilizando oligonucleótidos diseñados en los extremos 5' y 3' de las regiones codificantes y con secuencias que estuvieran conservadas en todos los torovirus porcinos descritos. Además, se añadieron secuencias de reconocimiento para las enzimas de

restricción *Bam*HI en el oligonucleótido que hibridaría en el extremo 5' de la región codificante y *Xba*I en el oligonucleótido que hibridaría en el extremo 3', para el posterior clonaje en las mismas dianas del plásmido correspondiente.

Oligonucleótido	Secuencia (5'→3')	Orientación	Localización
PToV-N5'	<u>GGATCC</u> ATGAATTCTATGCTTA	+	ORF-N
PToV-N3'	TCTAGATTAATTCAAAGCCACTT	-	ORF-N
PToV-M5'	<u>GGATCC</u> ATGTTTGATACAAA	+	ORF-M
PToV-M3'	TCTAGACTACTCAAACCTTACACTTG	-	ORF-M
PToV-HE5'	<u>GGATCC</u> ATGTTGAGGATGAG	+	ORF-HE
PToV-BRES2 HE5'	<u>GGATCC</u> ATGTTGAGGATGAT	+	ORF-HE
PToV-HE3'	CGTCTAGAGCCTAATAACTACTTAAACA	-	ORF-HE
PToV-S5'	<u>GGATCC</u> ATGTTTTATTGTTCTG	+	ORF-S
PToV-S3'	TCTAGACCTTATAGGCATCTAAC	-	ORF-S

Tabla 2 Oligonucleótidos utilizados en este trabajo para el clonaje de los genes de PToV. Las secuencias para el reconocimiento de enzimas de restricción se indican subrayadas. Los codones de inicio y de parada de la traducción se indican en negrita.

6.3.2. RT-PCR para clonajes.

Para la amplificación de los genes HE, M y N se utilizó como molde, cDNA obtenido a partir del RNA de PToV-BRES2 y se llevaron a cabo las siguientes reacciones de PCR:

•PToV-BRES2-N:

La amplificación de la secuencia codificante de la proteína N se llevó a cabo utilizando los oligonucleótidos PToV-N5' y PToV-N3', en una reacción de PCR que contenía 2µl de cDNA, 2,5 µl de tampón de PCR 10X (20mM de Tris-HCl (pH 8,0); KCl 50mM), 1,5mM de MgCL₂, 0,2µM de cada oligonucleótido, 0,2 µM de dNTPs; 1U de la DNA polimerasa Taq platinum (Invitrogen, corp) y 18µl de agua libre de DNAsas. El programa de amplificación consistió en 2 minutos a 92 °C; 30 ciclos de 40 segundos a 92 °C, 40 segundos a 50 °C y 40 segundos a 72 °C; y finalmente un ciclo de 5 minutos a 72 °C.

•PToV-BRES2-M:

La secuencia codificante de la proteína M se amplificó utilizando los oligonucleótidos PToV-M5' y PToV-M3'. El resto de los componentes de la mezcla de reacción fueron los mismos que en el caso anterior. El programa de amplificación fue: 2 minutos a 92 °C; 20 ciclos de 40 segundos a 92 °C, 40 segundos a 50 °C y 40 segundos a 72 °C; seguidos de 10 ciclos en los que a cada ciclo se añadía 20 segundos más al tiempo de extensión y finalmente un paso de 5 minutos a 72 °C.

•PToV-BRES2-HE:

En primer lugar, a partir de cDNA obtenido por RT y utilizando los oligonucleótidos PToV-HE3' y ToV-M5' amplificamos la secuencia codificante de la proteína HE junto con parte del gen M y la región intergénica entre ambos genes. El producto de esta reacción se secuenció y esta secuencia permitió diseñar el oligonucleótido PToV-BRES2-HE5' en la región 5' del gen HE. Así, los oligonucleótidos PToV-BRES2-HE5' y PToV-HE3' se utilizaron para amplificar el gen HE de forma independiente a partir del cDNA. La reacción se llevó a cabo utilizando el sistema *High Fidelity System*, (Eppendorf) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se añadieron 2µl de cDNA a una mezcla de reacción que contenía 1X *high fidelity buffer* (Eppendorf), 200µM dNTPs, 200nM de cada oligonucleótido y 0.71U/µl de la mezcla de enzimas *TripleMaster polymerase mix*. La mezcla de reacción se incubó a 93 °C 3 minutos, seguido de 10 ciclos de 1 minuto a 93 °C, 40 segundos a 50 °C y 5 minutos a 68 °C, y 25 ciclos en los que el tiempo de extensión se aumentaba 20 segundos en cada ciclo. Por último, se añadió un paso de 10 minutos a 68 °C.

6.4. ANÁLISIS DE DNA MEDIANTE SEPARACIÓN ELECTROFORÉTICA Y EXTRACCIÓN DE DNA A PARTIR DE GELES DE AGAROSA.

Los fragmentos de DNA obtenidos tanto por RT-PCR como por digestión con enzimas de restricción se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa del 0,8% al 2% en TBE (Tris base 45mM, ácido bórico 45mM, EDTA 1mM, pH 8,0) en presencia de bromuro de etidio (0,5µg/ml) para su visualización.

Los fragmentos de DNA se recuperaron de los geles de agarosa utilizando el método comercial de extracción en gel (*Gel Extraction Kit*, Qiagen).

6.5. MANIPULACIÓN DE DNA EN PROCESOS DE CLONACIÓN

El tratamiento del DNA con enzimas de restricción se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del proveedor. Como norma general las digestiones se llevaron a cabo a 37 °C durante toda la noche, a no ser que las instrucciones de la enzima lo contraindicasen, en cuyo caso, el tiempo de reacción se redujo a 3 horas.

Las reacciones de ligación del DNA se realizaron utilizando la enzima DNA ligasa del bacteriofago T4 (New England Biolabs) siguiendo el protocolo suministrado por el fabricante. Se utilizaron como mínimo 50ng de vector y una razón molar de vector:inserto mayor o igual a 1:3. La reacción se llevó a cabo mediante una incubación a temperatura ambiente toda la noche y en un volumen de reacción de 10µl.

6.6. PLÁSMIDOS

6.6.1. DERIVADOS DE pGEM-T®

El vector comercial pGem-T® *easy* (Promega) se utilizó para el clonaje de los fragmentos amplificados por RT-PCR, a partir del RNA extraído de la muestra PToV-BRES2, obteniéndose las siguientes construcciones. El vector pGem-T® *easy* se comercializa linearizado y preparado para clonar directamente fragmentos obtenidos por PCR.

- **pGT-ToV-M:** Contiene el fragmento ToV-M de BEV amplificado por RT-PCR utilizando los oligonucleótidos ToV-M5' y ToV-M3' (Tabla 3).
- **pGT-Pol1b:** Contiene el fragmento Pol1b de BEV obtenido por RT-PCR utilizando los oligonucleótidos ToV-Pol1b5' y ToV-Pol1b3' (Tabla 3).
- **pGT-MC+:** Contiene el fragmento del cromosoma 15 humano amplificado con los oligonucleótidos ToV-M5' y ToV-M3' (Tabla 3), con una delección de 30 pb.
- **pGT-PToVBRES2-N593:** Contiene el fragmento N593 de PToV-BRES2 amplificado por RT-PCR utilizando los oligonucleótidos 593 y 620 descritos previamente (Kroneman y col., 1998).
- **pGT-PToVBRES2-ToV-M:** Contiene el fragmento ToV-M de PToV-BRES2 obtenido por RT-PCR utilizando los oligonucleótidos ToV-M5' y ToV-M3' (Tabla 3).
- **pGT-BToVBRES2-ToV-M:** Contiene el fragmento ToV-M de BToV-BRES2 obtenido por RT-PCR utilizando los oligonucleótidos ToV-M5' y ToV-M3' (Tabla 3).
- **pGT-PToVBRES2-N:** Contiene el gen N de PToV-BRES2, obtenido por RT-PCR utilizando los oligonucleótidos PToV-N5' y PToV-N3' (Tabla 2).
- **pGT-PToVBRES2-M:** Contiene el gen M de PToV-BRES2, obtenido por RT-PCR utilizando los oligonucleótidos PToV-M5' y PToV-M3' (Tabla 2).
- **pGT-PToVBRES2-M3'-HE:** Contiene el fragmento M3'-HE de PToV-BRES2 amplificado por RT-PCR utilizando los oligonucleótidos ToV-M5' y PToV-HE3' (Tabla 2).
- **pGT-PToVBRES2-HE:** Contiene el gen HE de PToV-BRES2, amplificado mediante RT-PCR utilizando los oligonucleótidos PToV-BRES2-HE5' y PToV-HE3' (Tabla 2).

6.6.2. DERIVADOS DE pFASTBAC™HT

Las regiones codificantes de las proteínas N, M y HE se clonaron en el vector pFastBac™HT (Invitrogen, corp) para la generación de baculovirus recombinantes. Este plásmido se utilizó para la construcción de los siguientes vectores:

- **pFB-PToVBRES2-N:** El fragmento de DNA correspondiente al gen N de PToV-BRES-2 se subclonó en el vector pFastBacHTc. Para ello el plásmido pGT-BRES2-N se digirió con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Xba*I y el fragmento fue purificado y se clonó en los

misimos lugares de restricción del plásmido pFastBacHTc, previamente digerido con las mismas enzimas de restricción.

- **pFB-PToVBRES2-M:** El fragmento de DNA correspondiente al gen M de PToV-BRES-2 se subclonó en el vector pFastBacHTc. Para ello el plásmido pGT-BRES2-M se digirió con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Xba*II. Tras la purificación del fragmento obtenido éste se insertó en el plásmido pFastBacHTc, previamente digerido con las mismas enzimas de restricción.
- **pFB-PToVBRES2-HE:** El gen HE de PToVBRES2 se subclonó en el vector pFastBacHTc. Para ello el plásmido pGT-PToVBRES2-HE se digirió con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Xba*II. Tras purificar el fragmento obtenido éste se insertó en el plasmado pFastBacHTc, previamente digerido con las mismas enzimas de restricción.

6.6.3. DERIVADOS DE PJR101

El vector pJr101 previamente descrito (Gherardi y col., 1999) se utilizó para la generación de recombinantes del virus vaccinia.

- **pJR-BRES2-HE:** El fragmento de DNA correspondiente al gen HE de PToV-BRES-2 se obtuvo mediante restricción enzimática del plásmido pGT-BRES2-HE con *Bam*HI y *Nco*I y se subclonó en el vector pJR101, previamente digerido con las mismas enzimas.

6.7. EXTRACCIÓN DE DNA PLASMÍDICO.

Para las preparaciones analíticas de DNA plasmídico se utilizó el *kit* comercial Quiaprep® *miniprep kit* (Quiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante. El material así obtenido se utilizó para los procesos de secuenciación y análisis de clones por restricción enzimática. Los plásmidos que se utilizaron para clonaje y transfección en células de mamífero se purificaron utilizando el *kit* comercial Quiagen® *plasmid midiprep* (Quiagen).

La extracción y purificación de bácmidos se llevó a cabo mediante el procedimiento estándar de lisis alcalina (Sambroock y col., 2001).

Los plásmidos se conservaron a -20 °C, mientras que los bácmidos se conservaron a 4 °C.

7. MANIPULACIÓN DE CÉLULAS Y VIRUS.

7.1. GENERACIÓN DE BACULOVIRUS RECOMBINANTES.

La generación de baculovirus recombinantes se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante del sistema *Bac-to-Bac* (Invitrogen, corp). Los plásmidos derivados del vector pFastBacHTc (ver apartado 2.7.2) se utilizaron para transformar bacterias competentes DH10bac, donde por recombinación homóloga se generó un bácmido recombinante que

contenía el gen de interés integrado en el genoma de baculovirus y bajo el promotor de la polihedrina. Las bacterias se crecieron durante 3 días en presencia del sustrato análogo de la β -galactosidasa, X-Gal. La actividad β -galactosidasa se pierde en el bácmido recombinante debido a la interrupción del gen LacZ tras la recombinación del casete Tn7R-Tn7L, que contiene nuestro gen de interés. Se seleccionaron por blanco/azul dos clones independientes de cada transformación y se crecieron. Los bácmidos recombinantes se purificaron por lisis alcalina y se utilizaron para transfectar células de insecto *High Five*. Para ello, se mezclaron 5 μ l de bácmido purificado con 30 μ l de Lipofectina (Invitrogen, corp) y se incubó la mezcla durante media hora a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se retiró el medio de las células, se les añadió la mezcla de transfección suplementada con 900 μ l de medio TC-100 sin suero y se incubaron las células 5 horas a 28 °C. A continuación, se eliminó el medio de transfección y se incubaron las células en 2 ml de TC-100 con FCS al 10% hasta observar efecto citopático, aproximadamente 72-96 horas. Tras este tiempo se recogió el sobrenadante de las células y se guardó a 4 °C como *stock* primario del baculovirus recombinante.

7.2. GENERACIÓN DE VIRUS RECOMBINANTES DE VACCINIA

El virus rVV-HE se generó infectando células BSC40 con un virus vaccinia parental (WR) y transfectando a continuación con el plásmido pJR101-BRES2-HE, siguiendo un protocolo similar al utilizado en la generación de los recombinantes de baculovirus. A las 48 hpi, se recogieron las células en medio DMEM sin suero y se centrifugaron a 2000rpm durante 10 minutos. Las células depositadas se resuspendieron en DMEM y se lisaron mediante tres ciclos de congelación/descongelación seguidos de 3 pulsos de sonicación de 10 segundos a 80V cada uno. Este extracto se utilizó para infectar nuevos cultivos de células BSC40 y se seleccionaron los virus recombinantes cuyas placas de lisis adquirieron color azul tras la adición de X-gluc al medio de cultivo con agar (Carroll y Moss, 1995). El proceso de selección se llevó a cabo tres veces antes de producir un *stock* primario del virus recombinante rVV-HE.

7.3. AMPLIFICACIÓN DE VIRUS

El virus BEV se amplificó en células E.Derm y los virus TGEV y PRRSV en células ST y MA104, respectivamente. Para ello se infectaron monocapas confluentes de células a una multiplicidad de infección (MOI) de 0,5 en medio sin FCS y se incubaron durante 1 hora a 37 °C. A continuación, se retiró el medio de infección y se añadió medio con 2% de FCS. En el momento de máxima liberación de virus, 24 horas post-infección (hpi) para el BEV o cuando se observa un efecto citopático del 20% para TEGV y el PRRSV se recogió el medio de cultivo,

conteniendo el virus extracelular. Este medio de cultivo se centrifugó a 2000rpm durante 15 minutos a 4 °C para eliminar restos celulares y el sobrenadante se congeló a -80 °C.

Los baculovirus recombinantes se amplificaron de igual forma a partir de los *stocks* primarios de los virus. Cuando el efecto citopático era del 80%, aproximadamente 3-4 días post-infección (dpi) se recogió el medio de cultivo y se guardaron como *stocks* secundarios.

El virus vaccina WR y los virus recombinantes derivados de él se recuperaron a partir de monocapas confluentes de células BSC40 infectadas a baja MOI e incubados durante 48-72 horas a 37 °C. Las células se recogieron en medio DMEM sin suero mediante raspado y se centrifugaron a 2000rpm durante 10 minutos. Las células depositadas se resuspendieron en DMEM y se lisaron mediante tres ciclos de congelación/descongelación seguidos de 3 pulsos de sonicación de 10 segundos a 80V cada uno. Los restos celulares se descartaron mediante centrifugación durante 10 minutos a 2500rpm. El sobrenadante se congeló a -80 °C.

7.4. PURIFICACIÓN DE VIRUS.

Para la purificación de BEV utilizamos el procedimiento establecido en el laboratorio (Garzon y col., 2006; Garzón y col., 2006), a partir del protocolo descrito anteriormente (Weiss y col., 1983). Las partículas virales presentes en el medio de cultivo se concentraron mediante centrifugación a 25000 rpm durante 2h sobre un colchón de sacarosa al 20%. Las partículas se resuspendieron en medio TEN (Tris-HCl 10mM, pH 7,4, EDTA 1mM y NaCl 150mM) y se ultracentrifugaron sobre un gradiente de sacarosa del 15-45% a 25000 rpm durante 2 horas. Se recogieron 12 fracciones de 1ml que se analizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) (Sambroock y col., 2001) seguido de una tinción de plata. Las fracciones donde se localizaban las proteínas del virus se agruparon, se diluyeron en medio TEN y las partículas virales se concentraron mediante ultracentrifugación a 25000rpm durante 1 hora en un rotor SW41. Finalmente, las partículas se resuspendieron en una centésima parte del volumen de medio de cultivo utilizado.

Los virus TGEV y PRRSV purificados mediante centrifugación en un gradiente de sacarosa 20-60% fueron cedidos por el laboratorio del Dr. Luis Enjuanes.

7.5. TITULACIÓN DE VIRUS POR ENSAYO DE PLACA.

Los distintos virus utilizados se titularon por unidades formadoras de placas por ml (ufp/ml). Para ello se infectaron monocapas confluentes de las líneas celulares correspondientes crecidas en placas de cultivo de 6 pocillos (Nunc) con diluciones seriadas 1:10 del virus correspondiente en un volumen mínimo de medio DMEM. Tras una hora de adsorción se retiró el medio de infección y se añadió medio DMEM fresco con agar al 1% y FCS 2% (NCS en el caso

de los recombinantes del virus vaccinia). En la titulación de BEV el medio contenía además DEAE-Dextrano 0,05mg/ml. Las células se incubaron 2-3 días a 37 °C, tras los cuales se retiró el medio sólido y se tiñeron las células con cristal violeta al 1% en metanol al 2% para el conteo de las placas. En el caso de la titulación de los virus TGEV y PRRSV las células se fijaron con formaldehído al 10% durante 1 hora añadido sobre el medio con agar, antes de la tinción con cristal violeta.

7.6. TITULACIÓN DE VIRUS POR HEMOAGLUTINACIÓN.

El virus BEV se tituló además por unidades de hemoaglutinación por ml (UH/ml), según está descrito anteriormente (Burlason y Chambers, 1992). Se incubaron diluciones seriadas 1:2 de BEV purificado en PBS con 50µl de eritrocitos (RBCs) de conejo al 1% en PBS, en placas de 96 pocillos de fondo cónico (Nunc). La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante media hora. El título de virus por UH/ml se definió como el recíproco de la dilución menor capaz de aglutinar los eritrocitos al 100%.

Para preparar la solución de RBCs, la sangre de los animales se diluyó en un volumen doble de medio Alsever estéril (0,8% citrato sódico, 0,055% ácido cítrico, 2,05% glucosa y 0,42% cloruro sódico, pH 6,2). Las RBCs se lavaron 3 veces con medio Alsever centrifugando a 1200rpm, 10 minutos a 4 °C. A continuación se resuspendieron en 14 ml de medio Alsever, se contaron utilizando una cámara de Neubauer y se diluyeron al 10% ($8 \cdot 10^8$ células/ml) en PBS.

7.7. ENSAYO DE ACTIVIDAD ACETILESTERASA (ANAE).

Los ensayos de actividad acetilesterasa en células se realizaron utilizando el reactivo comercial α -naftil acetato (Sigma), según las instrucciones del fabricante y según se describió anteriormente (Wagaman y col. 1988). Se crecieron células BSC40 en placas de 6 pocillos (Nunc) hasta confluencia y se infectaron con aproximadamente 100 unidades formadora de placas (ufp) de virus rVV-HE. Las células se mantuvieron en medio DMEM conteniendo 2% de FCS y 1% de agar durante 48 horas. Transcurrido este tiempo, se retiró el agar y se fijaron las células durante 1 minuto con una solución de acetona-formaldehído a una proporción (2,6:0,32) en tampón citrato (ácido cítrico 18mM, citrato sódico 9mM, cloruro sódico 12mM, pH 3,6). Las células fijadas se lavaron tres veces con PBS frío, se añadió el reactivo α -naftil acetato a una concentración de 300µg/ml en tampón TRIZMAL™ (Sigma) y se incubó la placa a la temperatura indicada en cada caso. A continuación, las células se lavaron cuatro veces con PBS y se tiñó la monocapa de células con cristal violeta para visualizar las placas de lisis.

7.8. ENSAYO DE HEMADSORCIÓN.

El ensayo de hemadsorción se llevó a cabo utilizando RBCs de rata, ratón, conejo y humano, según está descrito (Hutson y col, 2002). Se crecieron células BSC40 al 75% de confluencia en placas de 6 pocillos (Nunc) y se infectaron a alta multiplicidad (MOI 5) con los virus que se indique en cada caso. A las 24 hpi se retiró el medio de infección, se lavaron las células tres veces con PBS frío y se incubaron durante 30 minutos con 2 ml de una solución de RBCs al 0,5% (preparada según se describe en el apartado 7.6) a 4 °C o a 37 °C, según se indique. Tras varios lavados con PBS frío, se fijaron las células con paraformaldehído al 4% y el resultado se observó en el microscopio óptico.

8. MANIPULACIÓN DE PROTEÍNAS

8.1. ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO DE PROTEÍNAS EN SDS-PAGE

El análisis electroforético de proteínas se llevó a cabo mediante SDS-PAGE. Las proteínas una vez separadas se visualizaron mediante tinción con el colorante azul de coomassie (BioRad) al 0,05% en una solución de metanol al 50% y ácido acético al 10% (Sambroock y col., 2001). El exceso de colorante se eliminó con una solución de ácido acético al 7%.

8.2. INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE WESTERN-BLOT

Las proteínas separadas mediante electroforesis en SDS-PAGE se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Whatman) utilizando el sistema *Transblot SD semidry cell* (BioRad), utilizando como tampón de transferencia una solución que contiene Tris 25mM, glicina 190mM, metanol al 20% y SDS al 0,1%. La transferencia se llevó a cabo durante 45 minutos a un amperaje constante de 200 mA. Para comprobar la eficacia de la transferencia las membranas se tiñeron con rojo Ponceau-S al 2% en una solución de ácido acético al 3%.

Las membranas se lavaron con PBS, se saturaron con una solución de leche desnatada en polvo al 5% en PBS conteniendo Tween 20 al 0,05% (PBST) durante 40 minutos en agitación suave y se incubaron con el anticuerpo primario diluido en solución de saturación, bien durante 1 hora a temperatura ambiente o toda la noche a 4 °C en agitación. Las membranas se lavaron tres veces con PBST y a continuación se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente a una dilución 1:1000 en solución de saturación, durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, las membranas se lavaron tres veces con PBST y el *western-blot* se reveló mediante quimioluminiscencia utilizando el sistema comercial ECL (Amersham

Biosciences), seguido de la exposición a una película autorradiográfica de alta sensibilidad (Biomax XAR film, Kodak).

8.3. INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS POR MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA.

El estudio de los patrones de expresión de las proteínas se llevó a cabo mediante inmunofluorescencia y microscopía confocal. Las células se sembraron al 50% de confluencia en cubreobjetos redondos de 12mm de diámetro, se infectaron a MOI 5 con el virus correspondiente y se incubaron a 37 °C. Al tiempo postinfección que se indique en cada caso, las células se lavaron tres veces con PBS frío y se fijaron con una solución de paraformaldehído al 4% en tampón fosfato. A continuación, las células se permeabilizaron con Tritón X-100 al 1% en PBS durante 5 minutos, o bien, se dejaron sin permeabilizar. Se saturaron los cristales con FCS al 10% en PBS y se incubaron con el anticuerpo primario diluido en la solución de saturación durante 1 hora a 37 °C. A continuación, se lavaron tres veces con PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario marcado con un fluoróforo. Los cristales fueron fijados al portaobjetos con el producto comercial *Prolong Gold antifade* (Molecular Probes, Inc). Las células se visualizaron mediante microscopía confocal utilizando el sistema de confocal BioRad Radiance 2000 (BioRad Laboratories, Inc) acoplado a un microscopio Zeiss Axiovert 200 (Zeiss, SA).

8.4. PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES POR CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD.

8.4.1. PURIFICACIÓN MEDIANTE RESINA DE COBALTO.

Las proteínas recombinantes de PToV expresadas en células de insecto se purificaron mediante cromatografía de afinidad utilizando una resina comercial de cobalto (Talon™, Clontech). Brevemente, $7,5 \cdot 10^8$ células *High Five*, infectadas a alta multiplicidad, se recogieron en el momento de máxima infección, aproximadamente 48 hpi. Las células se recuperaron por centrifugación a 3000 rpm 10 minutos y se lavaron dos veces con PBS. Tras los lavados, las células se resuspendieron en 30 ml de una solución de lisis que contenía guanidina 6M, NaCl 300 mM, H_2NaPO_4 50 mM, pH 8,0 e imidazol 1mM, se homogenizaron por agitación, se incubaron en hielo durante 30 minutos y se sometieron a 3 pulsos de sonicación a 80V durante 10 segundos. Para eliminar los restos celulares se centrifugó el extracto de células a 3000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. El sobrenadante (10ml) se añadió a 2 ml de resina de cobalto previamente estabilizada en la misma solución de lisis y se incubó durante 2 horas a 4 °C en una noria. Transcurrido este tiempo se recuperó la resina mediante centrifugación a 1500 rpm

durante 5 minutos, y se lavó tres veces con solución de lisis sin imidazol. A continuación, se realizaron tres lavados con una solución de urea 8M, NaCl 300 mM, H_2NaPO_4 50 mM, pH 8,0, tras los cuales se añadieron dos volúmenes de una solución de imidazol 1M, urea 8M, 300 mM NaCl, H_2NaPO_4 50 mM, pH 8,0. La resina se mantuvo en agitación en la noria toda la noche a 4 °C y tras una centrifugación se recogió el sobrenadante (elución 1) y se añadió de nuevo tampón de elución a la resina. Tras 20 minutos de agitación en la noria y a temperatura ambiente, se centrifugó y se recogió el sobrenadante (elución 2), Este proceso se repitió una tercera vez (elución 3).

8.4.2. PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE INMUNOCAPTURA

La proteína HE de PToV se purificó a partir de células BSC40 infectadas con 5 ufp/cel del virus vaccinia. A las 24 hpi se recogieron las células en una solución de lisis (Tris-HCl 20 mM, pH 6,5, NaCl 40 mM, EDTA 20 mM y Tritón X-100 al 0,1%), se homogenizaron, se incubaron en hielo durante 30 minutos y se sometieron a 3 pulsos de sonicación a 80V durante 10 segundos. A continuación, los restos celulares se descartaron mediante centrifugación y el sobrenadante se añadió sobre una décima parte del volumen de proteína A-sefarosa, a la que previamente se le habían acoplado anticuerpos de conejo anti-HEpept, mediante una incubación de tres horas con una dilución 1:100 del suero en PBS con 3% de albúmina de suero bovina (BSA). La mezcla se incubó durante dos horas a temperatura ambiente en agitación. Tras tres lavados con la solución de lisis se eluyó la proteína utilizando una mezcla de los péptidos 286E1 y 286F1 a una concentración de 1 mg/ml de cada uno e incubando en agitación a 4 °C durante toda la noche. Posteriormente se hicieron dos eluciones más incubando cada vez la sefarosa con la mezcla de péptidos durante 2 horas a temperatura ambiente.

Las muestras de los distintos pasos de purificación se analizaron mediante SDS-PAGE y tinción del gel con azul de coomassie o mediante *western-blot* utilizando para ello un anticuerpo producido en rata frente al péptido 286E1 (Anti-HE286E1).

8.5. ENSAYOS DE ENTRECruzAMIENTO QUÍMICO

Para los ensayos de entrecruzamiento químico se utilizaron los agentes DTSSP (3,3'-ditiobis(sulfosuccinimidilpropionato)) y BS³ (Bis(sulfosuccinimidyl suberato) (Pierce) siguiendo las instrucciones del fabricante. El reactivo DTSSP se preparó a una concentración inicial de 20mM en etanol al 99% (Sigma), a partir de la cual se hicieron diluciones seriadas 1:2 en PBS para obtener una batería de concentraciones (5mM, 2,5mM y 1,25mM). El reactivo BS³ se preparó a una concentración inicial de 20mM en PBS, a partir de la cual se hicieron también diluciones 1:2 en PBS para obtener una batería de concentraciones (5mM, 2,5mM y 1,25mM).

Por último, se preparó una solución de N-etilmaleimida (NEM) (Pierce) 1 M en Etanol 99% (Sigma), a partir de la cual se prepararon las soluciones de concentración 20mM, 10mM y 5mM en PBS.

Se sembraron células BSC40 crecidas en placas de cultivo de 12 pocillos (Nunc), y se infectaron con el virus recombinante rVV-HE. A las 24hpi, las placas se pusieron sobre hielo, se retiró el medio de las células y se lavaron tres veces con PBS frío. Se añadió 1ml por pocillo de la dilución correspondiente del agente de entrecruzamiento químico, NEM o PBS y se incubó durante 10 minutos en hielo. Se retiró el agente y se añadieron 2 ml de Tris-HCl 20mM, pH 8,0 a cada pocillo para bloquear la reacción. A continuación, se recogieron las células en 75µl de tampón de carga de proteínas (Tris-HCl 25mM, glicina 19mM, SDS 0,1%, pH 8,3) con o sin el agente reductor β-mercaptoetanol (5mM).

8.6. GENERACIÓN DE ANTICUERPOS.

La generación de anticuerpos se realizó mediante inoculación del inmunógeno correspondiente en conejos o ratas en el animalario del Centro Nacional de Biotecnología. Se inoculó una primera dosis de inmunógeno (500µg de proteína o péptido en conejos y 50µg en ratas) emulsionado con adyuvante completo de Freund, seguido de tres dosis de recuerdo del antígeno (250µg para los conejos y 25µg para las ratas) mezclado con adyuvante incompleto de Freund. Las sucesivas inoculaciones se espaciaron entre 21 y 30 días.

Diez días después de la última dosis se extrajo sangre para comprobar la reactividad del suero mediante *Western-blot*. Para obtener el suero a partir de la sangre, ésta se incubó primero 30 minutos a temperatura ambiente y luego toda la noche a 4 °C. A continuación se centrifugó la sangre a 4 °C durante 15 minutos a 2000rpm y se recogió el suero y se descartó el coágulo. Una vez comprobado que el suero reconocía la proteína de interés se realizó la sangría final y se sacrificó al animal.

9. ENSAYOS DE DIAGNÓSTICO

9.1. INMUNOMICROSCOPIA ELECTRÓNICA

El análisis para la detección de partículas de torovirus porcino en muestras de heces, mediante microscopía electrónica, se llevó a cabo en el servicio de microscopía electrónica del Centro de Biología Molecular-Severo Ochoa (Madrid), utilizando el protocolo descrito previamente (Smits y col., 2003). Brevemente, 50 µl de sobrenadante de heces se incubaron durante 1 hora a 37 °C con una dilución 1:40 del suero indicado en cada caso. A continuación, la

mezcla se adsorbió en una rejilla de cobre mediante centrifugación durante 15 minutos a 20 psi, utilizando un rotor Airfuge Beckman. Posteriormente para visualizar los anticuerpos éstos se marcaron con proteína A acoplada a oro coloidal de 10 nm. Tras la incubación con el conjugado de proteína A-oro coloidal se llevó a cabo una tinción negativa de las muestras con fosfotungstato sódico (PTA) al 2% durante 1 minuto. El resultado se visualizó utilizando un microscopio electrónico JEOL JEM-1010.

9.2. RT-PCR PARA DIAGNÓSTICO

En la tabla 3 se describen los oligonucleótidos utilizados en este trabajo para el diagnóstico de torovirus en muestras de heces. Los oligonucleótidos ToV-M5' y ToV-M3' (tabla 3) se diseñaron para amplificar una región dentro de la ORF M. También se utilizaron los oligonucleótidos PToV-593 y PToV-620, previamente descritos para la secuenciación de un fragmento del gen N de PToV (Kroneman y col., 1998).

Los oligonucleótidos PToV-NE2, PToV-NI1 y PToV-NI2 se diseñaron en una región de la ORF N y son específicos para PToV. Se utilizaron para el diagnóstico por RT-PCR semianinada.

Oligonucleótido	Secuencia (5'→3')	Orientación	Localización
ToV-M5'	AGTATGACCT TTA CTGGCTA	+	ORF-M
ToV-M3'	TAATCTGCAA CACCTTG	-	ORF-M
PToV-593	GTCAGAATAGATCACGCATT	+	ORF-N
PToV-620	AACTCTGCAACTCAGGTGGA	-	ORF-N
PToV-NE2	ACTCAGGTGGAATGTTGCGGA	-	ORF-N
PToV-NI1	CTATGTTTCAGAGGCGTAATAAT	+	ORF-N
PToV-NI2	GTCTCATTTGCCATCATAAG	-	ORF-N

Tabla 3 Oligonucleótidos utilizados en este trabajo para la detección de torovirus.

9.2.1. RT-PCR

Las reacciones de RT-PCR se llevaron a cabo utilizando como molde 2 µl de cDNA obtenido por RT y una mezcla de reacción que contenía 2,5 µl de tampón de PCR 10X (Tris-HCl 20mM, pH 8,0, KCl 50mM, MgCl₂ 1,5mM), dNTPs 0,2 mM, 0,2 µM de cada oligonucleótido, 0,2µl (1U) DNA polimerasa *Taq* Platinum (Invitrogen, corp) y 18,15 µl de agua libre de RNasas y DNasas (Invitrogen), en un volumen final de reacción de 25 µl.

El programa de amplificación utilizado fue el siguiente: 2 minutos a 94 °C; 35 ciclos de 40 segundos a 94 °C, 40 segundos a 45 °C y 40 segundos a 72 °C, y finalmente un ciclo de 5 minutos a 72 °C.

9.2.2. RT-PCR SEMIANIDADA

Las reacciones de PCR semianidada se llevaron a cabo utilizando como molde 2 µl del producto de la primera reacción y la misma mezcla de reacción utilizada en la PCR anterior, salvo por los oligonucleótidos. El programa de amplificación utilizado fue el siguiente: 2 minutos a 94 °C; 30 ciclos de 40 segundos a 94 °C, 40 segundos a 50 °C y 40 segundos a 72 °C y finalmente un ciclo de 5 minutos a 72 °C.

Las reacciones se prepararon en cabinas de flujo para PCR y con material exclusivamente dedicado a este procedimiento.

9.3. ENSAYOS SEROLÓGICOS.

9.3.1. ENSAYO INMUNOENZIMÁTICO (ELISA).

Los pocillos de placas de 96 pocillos (*Immunoplate F96 Maxisorp*, Nunc) se tapizaron por duplicado con 50µl del antígeno correspondiente diluido en tampón carbonato-bicarbonato 0,1M, pH 9,6. Las placas se incubaron toda la noche a 4 °C. A continuación se lavaron tres veces con 200µl de PBST y se saturaron con 180µl de BSA, fracción V (Sigma) al 3% en PBST durante 2 horas a 37 °C. El anticuerpo se diluyó, a la dilución indicada en cada caso, en una solución de BSA al 1% en PBST, y se añadió a los pocillos una vez retirada la solución de saturación. Tras 1 hora de incubación a 37 °C, se lavaron los pocillos como se indicó anteriormente, se añadió el anticuerpo secundario a una dilución 1:1000 en la solución de BSA, en PBST, y se incubó durante 1 hora a 37 °C. Se lavaron de nuevo los pocillos tres veces y se reveló el ELISA añadiendo 50µl por pocillo del sustrato dihidrocloruro de o-fenilendiamina (*OPD fast*, Sigma), preparado según las instrucciones del fabricante e incubando durante 10 minutos a temperatura ambiente. La reacción se detuvo mediante la adición de 50µl por pocillo de ácido sulfúrico 2N. Los valores de absorbancia se midieron a 492 nm en un espectrofotómetro multicanal (Titertek Multiscan MCC/340).

9.3.2. DETECCIÓN DE ANTICUERPOS POR WESTERN-BLOT.

En geles de SDS-PAGE al 13% se cargaron 400 ng por carril de proteína N recombinante purificada. Tras la electroforesis se transfirió la proteína a una membrana de nitrocelulosa tal y como se describió anteriormente y se tiñó con Rojo Ponceau. Antes de retirar la tinción se cortaron los carriles individualmente y se procedió a la inmunodetección tal y como se describió anteriormente (apartado 8.2). Todos los sueros se analizaron a una dilución 1:100 y las membranas se revelaron utilizando una solución de 4-cloronaftol (0.5mg/ml) en PBS y con peróxido de hidrogeno al 0.05% (Sigma). La intensidad de la señal obtenida se cuantificó por densitometría utilizando el programa informático *NIH Image* 1.62.

9.3.3. ENSAYO DE NEUTRALIZACIÓN DE LA INFECTIVIDAD VIRAL.

Los ensayos de neutralización de la infectividad viral se llevaron a cabo según se ha descrito anteriormente (Burleson y Chambers, 1992). Alícuotas de virus BEV conteniendo entre 150-200 ufp de virus BEV se incubaron durante una hora a 37 °C con agitación cada 15 min, con diluciones seriadas 1:2 de los sueros de cerdo a testar, previamente descomplementados. A continuación, estas mezclas se añadieron por duplicado sobre monocapas confluentes de células E.Derm crecidas en placas de 12 pocillos. Tras 1 hora de adsorción se retiró el inóculo y se añadió una mezcla de DMEM con agar al 1%, FCS al 2% y 0,05 mg/ml de DEAE-dextrano. A los 3 días postinfección se retiró el medio con agar, se tiñeron las células con cristal violeta (ver apartado 7.5) y se contaron las placas de lisis.

El título de anticuerpos neutralizantes de un suero se determinó como el recíproco de la dilución menor que neutraliza el 50% del virus (PDD50), según la fórmula de Langford y Stanton, (1981)

$$PDD50 = DL + \frac{(P_{50} - PL)(DH - DL)}{PH - PL}$$

Donde :

DL \equiv recíproco de la dilución menor que causa el 50% de neutralización.

DH \equiv recíproco de la dilución mayor que causa el 50% de neutralización.

P₅₀ \equiv número de placas teóricas en el 50% de neutralización.

PL \equiv número de placas en la dilución menor que causa el 50% de neutralización.

PH \equiv número de placas en la dilución mayor que causa el 50% de neutralización.

9.3.4. ENSAYO DE INHIBICIÓN DE LA HEMOAGLUTINACIÓN.

Los ensayos de inhibición de la hemoaglutinación se realizaron utilizando BEV purificado y siguiendo un procedimiento descrito previamente (Burleson y Chambers, 1992). Brevemente, alícuotas de una suspensión de virus BEV con 8UH/ml (Ver apartado 7.6) se incubaron durante 1 hora a 37 °C con diluciones seriadas en PBS de los sueros de cerdo previamente descomplementados. A continuación, se añadieron 50µl por pocillo de RBCs de conejo al 1% en PBS y se incubaron durante media hora a temperatura ambiente. El título de anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación (IH) se definió como el recíproco de la última dilución de anticuerpo que inhibía totalmente la hemoaglutinación.

RESULTADOS

1. DESARROLLO DE MÉTODOS MOLECULARES BASADOS EN LA RT-PCR PARA LA DETECCIÓN DE TOROVIRUS EN HECES

Entre las técnicas de diagnóstico molecular, la PCR es la más utilizada ya que ofrece una gran sensibilidad y especificidad. Por ello nos planteamos como primer objetivo el desarrollo de un método de RT-PCR para la detección de torovirus en muestras de heces.

1.1. DESARROLLO DE UNA RT-PCR PARA LA DETECCIÓN DE TOROVIRUS

Con el objetivo desarrollar un sistema de diagnóstico molecular por RT-PCR, para iniciar el estudio de los torovirus en España, nos propusimos utilizar oligonucleótidos con secuencias conservadas en el genoma de los torovirus de forma que este sistema sirviera para detectar, en muestras de heces, cualquier especie de torovirus. Para el desarrollo del sistema de RT-PCR utilizamos BEV como virus modelo ya que este es el único torovirus que podemos crecer en cultivo y por tanto, disponer de material genético de partida suficiente.

1.1.1. SELECCIÓN DE OLIGONUCLEÓTIDOS Y OPTIMIZACIÓN DE LOS MÉTODOS DE RT-PCR

Para el diseño de los oligonucleótidos se compararon en primer lugar todas las secuencias disponibles en GenBank de cada uno de los genes estructurales de torovirus y de las regiones ORF1b disponibles. Los genes S y HE mostraron ser los más variables en secuencia entre los distintos aislados de las distintas especies, así la homología entre las distintas especies de torovirus fue del 73%. Los genes M y N, por el contrario, mostraron una mayor conservación entre las distintas especies. El gen M mostró una homología del 85-95%, mientras que, para el gen N, la homología fue del 70-95%. A partir de esta comparación seleccionamos una región de 410 pb del gen M cuya secuencia está altamente conservada en todos los torovirus (80-98%) y diseñamos los oligonucleótidos ToV-M5' y ToV-M3' (ToV-M5'-3') para amplificar esta región (ver tabla 3 del apartado 9.2 de materiales y métodos).

Además, se diseñaron oligonucleótidos para amplificar una región de la RNA polimerasa, ya que esta región se ha utilizado previamente para el estudio de la evolución dentro de los Nidovirales (Koonin, 1991). En toroviurs solo se dispone de las secuencias de la región ORF1b de BToV y BEV por lo que, basándonos en estas secuencias seleccionamos una región de 610 pb conservada en un 87% entre BToV y BEV y se diseñaron los oligonucleótidos ToV-Pol1b5'

y ToV-Pol1b3' (ToV-Pol1b5'-3') para amplificarla (ver tabla 3 del apartado 9.2 de materiales y métodos).

A continuación, se utilizó un RNA viral obtenido a partir de una muestra de BEV purificado mediante el kit comercial *QIAamp® viral RNA extraction kit* (Quiagen). Este RNA se utilizó como molde para la síntesis de la cadena de DNA complementaria (cDNA), utilizando el sistema comercial SuperScriptII® y ésta se utilizó como molde para las reacciones de PCR con los oligonucleótidos ToV-M5'-3' y ToV-Pol1b5'-3'. Los oligonucleótidos ToV-M5'-3' amplificaron el fragmento esperado de 410pb de la región del gen M y los oligonucleótidos ToV-Pol1b5'-3', el fragmento esperado de 612pb, de la región de la RNA polimerasa. Estos amplicones se clonaron en el vector pGemT generándose los vectores pGT-ToV-M y pGT-pol1b.

Para optimizar las condiciones de la reacción de RT-PCR se probaron diferentes concentraciones de MgCl₂ en la mezcla de reacción entre 1,5 y 3 mM, así como diferentes temperaturas de hibridación de los oligonucleótidos. Mediante estos análisis se establecieron las condiciones de reacción descritas en el apartado de materiales y métodos.

1.1.2. COMPARACIÓN ENTRE LOS MÉTODOS DE RT-PCR PARA EL DIAGNÓSTICO DE TOROVIRUS

Una vez optimizadas las condiciones para las reacciones de PCR con las parejas de oligonucleótidos ToV-M5'-3' y ToV-Pol1b5'-3', quisimos determinar el límite de detección del método y compararlo con el de otras combinaciones de oligonucleótidos descritos anteriormente para el diagnóstico de torovirus e igualmente basados en la secuencia de BEV. En la literatura se han descrito dos parejas de oligonucleótidos para el diagnóstico de torovirus en heces: los oligonucleótidos 293 y 294 (293-294), diseñados en la región NTR-3' de BEV, que han sido utilizados previamente para la detección de PToV (Kroneman y col., 1998) y los oligonucleótidos NTR-5 y NTR-6 (NTR5-6), diseñados en la región 3' del gen N y la región NTR3' de BEV, respectivamente, que se utilizaron para el diagnóstico de BToV (Duckmanton y col., 1998). La secuencia del oligonucleótido NTR-6 está conservada en el genoma de PToV, no así, la secuencia del oligonucleótido NTR-5, por lo que esta combinación de oligonucleótidos no nos será útil para el diagnóstico de PToV.

Para determinar el límite de detección de los distintos métodos de RT-PCR con las distintas parejas de oligonucleótidos, utilizamos diluciones seriadas 1:10 de una preparación de BEV con un título 10⁶ ufp/ml. Aislamos el RNA viral a partir de 200µl de cada dilución de virus utilizando el kit comercial, *QIAamp® viral RNA extraction kit* (Quiagen) y sintetizamos

cDNA a partir de 8 μ l de RNA viral. Los cuatro métodos de PCR se llevaron a cabo en paralelo. Como control positivo para cada uno de los métodos, se utilizó una preparación de cDNA obtenido a partir de virus BEV purificado con un título de 10^8 ufp/ml.

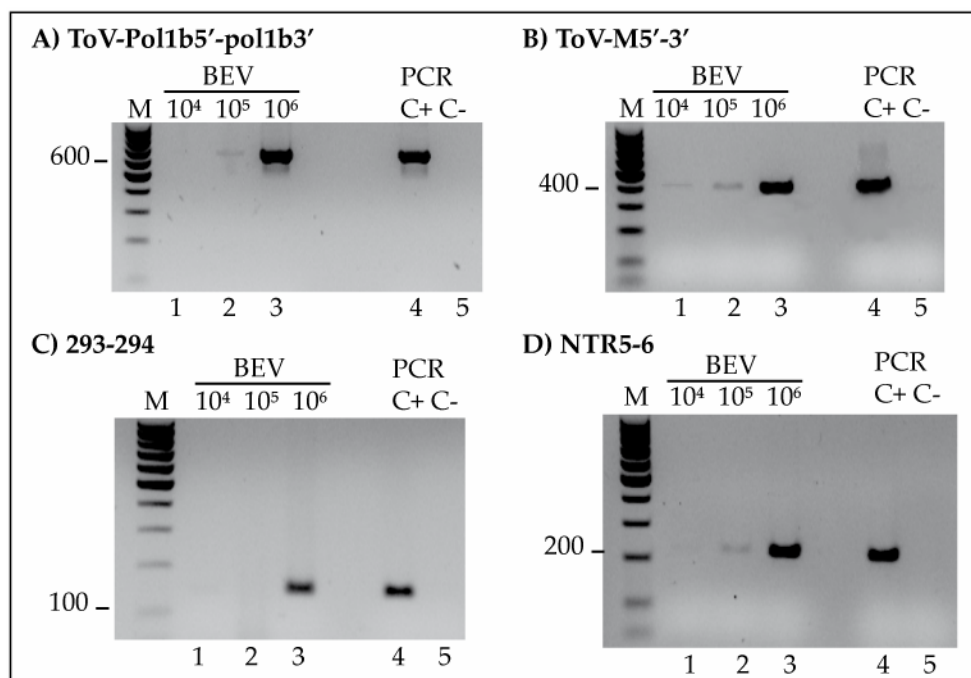


Figura 1. Análisis de la sensibilidad de los distintos métodos de RT-PCR descritos para ToV. Los distintos métodos de RT-PCR con los oligonucleótidos ToV-Pol1b5'-3' (A), ToV-M5'-3' (B), 293-294 (C) y NTR5-6 (D) se ensayaron frente a muestras de RNA extraído a partir de diluciones seriadas 1:10 de una preparación de virus BEV con un título inicial de 10^6 ufp/ml (10^4 , 10^5 y 10^6 ufp/ml). Como control positivo se utilizó una preparación de virus purificado con un título de 10^8 ufp/ml (PCR C+) y H₂O libre de RNasas y DNasas (Invitrogen) control negativo (PCR C-). Como marcadores de peso molecular se utilizó una escalera de DNA (M) y en cada panel se indica los pesos moleculares en pares de bases del marcador de peso molecular más próximo a cada fragmento amplificado.

Como se observa en la figura 1, con los oligonucleótidos ToV-M5'-3' y NTR5-6 conseguimos detectar hasta 10^4 ufp/ml (carril 1 en los paneles B y D, respectivamente), mientras que, con los oligonucleótidos ToV-Pol1b5'-3', el límite de detección fue 10 veces mayor (10^5 ufp/ml) (carril 2, panel A) y los oligonucleótidos 293-294 solo amplificaron el virus sin diluir (10^6 ufp/ml) (carril 3, panel C).

Por lo tanto, los procedimientos de RT-PCR utilizando los oligonucleótidos ToV-M5'-3' y NTR5-6, fueron los más sensibles. Sin embargo, los oligonucleótidos ToV-M5'-3' son *a priori* más versátiles ya que fueron diseñados para amplificar el genoma de cualquier torovirus, mientras que, como ya se indicó, el oligonucleótido NTR5 no está conservado en PToV, por lo que esta combinación de oligonucleótidos no serviría para detectar PToV.

1.1.3. OPTIMIZACIÓN DE LA RT-PCR PARA LA DETECCIÓN DE TOROVIRUS EN HECES

Una vez establecidas las condiciones óptimas para la reacción de RT-PCR, quisimos evaluar el comportamiento de los métodos de PCR en muestras de heces ya que éste va a ser nuestro material de partida para el diagnóstico de torovirus. Para ello se utilizaron diluciones seriadas 1:10 de virus BEV purificado partiendo desde un título de 10^6 ufp/ml hasta 10^3 ufp/ml. Las diluciones del virus se prepararon en una muestra de heces de un paciente con gastroenteritis diluida en PBS. Como controles de la PCR se utilizó el RNA obtenido a partir de 200µl de la muestra de heces diluidas pero sin virus (0), y controles negativos de agua para cada pareja de oligonucleótidos (C- ToV-Pol1b y ToV-M).

En primer lugar, como se observa en la figura 2, además de los fragmentos esperados de 612 y 410 pb de los genes Pol1b y M de BEV, respectivamente, se amplificaron otros fragmentos inespecíficos. Estos se observaron en las muestras sin virus (0) pero no en los controles negativos de agua, por lo que tienen su origen en ácidos nucleicos presentes en las heces. Cuando el RNA viral es mayoritario (panel A, carriles 4-5 y panel B, carriles 9-10) no se observan estas amplificaciones, sin embargo conforme la cantidad de RNA viral en la muestra disminuye se observa la aparición de las bandas inespecíficas. Esto afectaría a la sensibilidad y a la especificidad del método. En el caso de la amplificación con los oligonucleótidos ToV-Pol1b5'-3', esta pérdida de especificidad no es tan importante ya que la diferencia entre los pesos moleculares del fragmento inespecífico (400 pb) (panel A, carriles 1-3) y del fragmento específico (612 pb) (panel A, carriles 4-5) es suficiente para distinguirlos en un gel de agarosa. Sin embargo, en el caso de la amplificación con los oligonucleótidos ToV-M5'-3', la similitud de tamaño entre el fragmento inespecífico (400 pb) (panel B, carriles 6-8) y el fragmento específico (410pb) (panel B, carriles 9-10) dificulta la discriminación entre ambos y podría provocar la aparición de falsos positivos en los ensayos diagnósticos. Esta situación se hace más evidente en muestras con un título de virus cercano al límite de detección.

Por otra parte, dado que hemos utilizado una muestra de heces de un paciente humano con gastroenteritis y que los oligonucleótidos están diseñados para amplificar diferentes especies de torovirus, el fragmento de 400 pb amplificado con los oligonucleótidos ToV-M5'-M3', podría corresponder a un fragmento del gen M de torovirus humano (HToV). Sin embargo, la secuenciación de este fragmento mostró que éste no estaba relacionado con los torovirus, sino que tenía una homología del 99% con una región no codificante de 405 pb del cromosoma 15 humano.

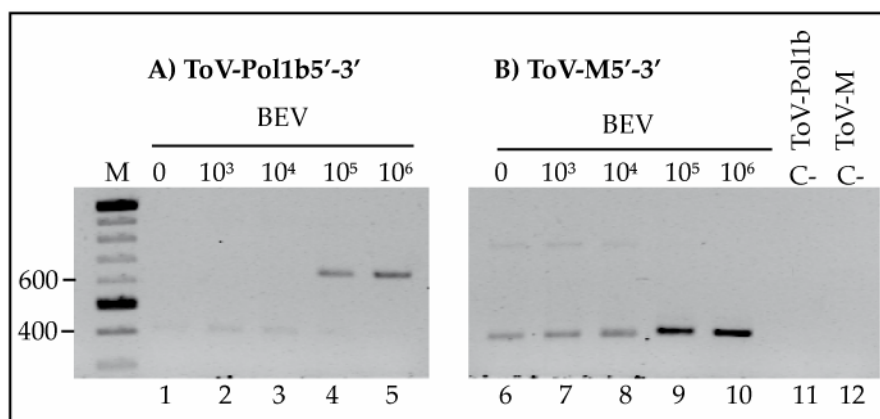


Figura 2. Análisis de la sensibilidad de los métodos de RT-PCR en muestras de heces. Se ensayó la sensibilidad de los métodos de RT-PCR con los oligonucleótidos ToV-Pol1b5'-3' (A) y ToV-M5'-3' (B), para detectar la presencia de RNA viral en muestras de heces de un paciente con gastroenteritis a las que añadimos diluciones seriadas 1:10 de virus BEV purificado (0, 10³, 10⁴, 10⁵ y 10⁶ ufp/ml). Como marcadores de peso molecular se utilizó una escalera de DNA (M), en la figura se indican los pesos moleculares en pares de bases de los marcadores de peso molecular próximos a cada fragmento amplificado.

Clonamos el fragmento de DNA humano en el vector pGemT y mediante digestión con *AluI* y ligación se delecionó un fragmento de 30 pb. Esta construcción, que denominamos pGT-MC+, junto con la construcción pGT-Pol1b (apartado 1.1.2) nos servirán como controles positivos en futuros análisis por PCR con los oligonucleótidos ToV-M5'-M3' y ToV-Pol1b5'-3', respectivamente.

Estos resultados indican que el método utilizado para el aislamiento de RNA viral a partir de heces no es el más idóneo, ya que no es capaz de eliminar posibles fragmentos de DNA presentes en las heces.

1.1.4. OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE RNA VIRAL EN HECES

Con el objetivo de optimizar el método de aislamiento de RNA, se utilizó el kit de extracción de RNA *High pure RNA isolation Kit* (Roche), que incluye un paso de tratamiento con DNaseI en la misma columna de purificación.

Para comparar la eficiencia de recuperación de RNA, así como la eliminación de ácidos nucleicos contaminantes de la muestra, se utilizó el método *High pure RNA isolation Kit* (Roche) y en paralelo el método *QIAamp® viral RNA extraction kit* (Quiagen), utilizado en los ensayos anteriores, para aislar RNA a partir de heces en las que se habían diluido BEV a 10⁵ y 10⁴ ufp/ml. El RNA obtenido con ambos métodos se analizó mediante PCR y RT-PCR con las dos parejas de oligonucleótidos ToV-M5'-3' y ToV-pol1b5'-3'.

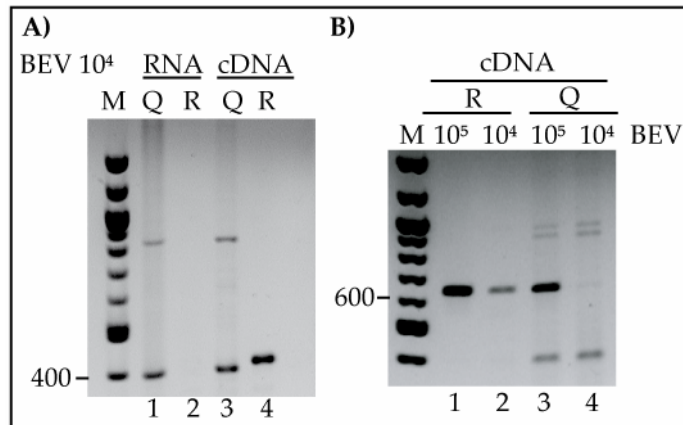


Figura 3. Comparación entre los kits de extracción de RNA. Las muestras de RNA obtenidas utilizando el kit comercial de Roche (R) o de Quiagen (Q), así como los cDNAs obtenidos a partir de estos RNAs se analizaron mediante PCR con los oligonucleótidos ToV-M 5'-3' (A) y ToV-Pol1b5'-3' (B). Los resultados se visualizaron en geles de agarosa al 2%.

Como se observa en la figura 3, la utilización del kit de Roche (carriles 2 y 4 del panel A y carriles 1 y 2 del panel B) nos permitió eliminar el DNA contaminante que se obtenía al utilizar el kit de Quiagen (carriles 1 y 3 del panel A y carriles 3 y 4 del panel B). De esta forma, con el kit de Roche se obtiene una señal de amplificación a partir del cDNA más nítida, y que nos permite recuperar en heces el límite de detección de 10⁴ ufp/ml (panel A, carril 4) obtenido con estos mismos oligonucleótidos a partir de virus BEV purificado. Además mejoró el límite de detección con los oligonucleótidos ToV-Pol1b5'-3' (panel B carriles 1 y 2). Con estos resultados en los ensayos posteriores utilizaremos el kit de Roche para el aislamiento de RNA viral a partir de muestras de heces.

1.2. ANÁLISIS MEDIANTE RT-PCR DE LA PRESENCIA DE TOROVIRUS EN HECES

Una vez puestos a punto los métodos de RT-PCR para la detección de torovirus en muestras de heces, analizamos la presencia de torovirus porcino (PToV) en granjas españolas. Para ello, nos pusimos en contacto con explotaciones de ganado porcino de diferentes regiones de España para que nos suministraran muestras de heces de lechones con síntomas de diarrea en los que no se hubiera detectado el agente causante. También nos pusimos en contacto con el Dr. Lavazza del *Istituto zooprofilattico della Lombardia ed Emilia* (Brescia, Italia) para solicitarle que nos enviara muestras de heces en las que hubieran observado la presencia de partículas virales de torovirus mediante microscopía electrónica.

En total nos enviaron 15 muestras de heces de lechones procedentes de granjas de Cataluña (7 muestras), Aragón (4 muestras) y Valencia (4 muestras). Por su parte el Dr. Lavazza nos remitió 5 muestras, tres de las cuales pertenecían a lechones (P-BRES1, P-BRES2 y P-BRES3) y dos a terneras (B-BRES1 y B-BRES2) en las que se había detectado la presencia de

partículas virales de torovirus, coronavirus y rotavirus mediante inmunomicroscopía electrónica (Datos no publicados).

Analizamos todas las muestras de heces por RT-PCR utilizando las parejas de oligonucleótidos ToV-M5'-3' y ToV-Pol1b5'-3'. También con los oligonucleótidos 593 y 620 que habían sido descritos anteriormente como oligonucleótidos específicos para PToV y que amplificarían un fragmento de 180 pb del gen N (Kroneman y col., 1998). En todas las reacciones utilizamos como control positivo para los oligonucleótidos ToV-M5'-3', el plásmido pGT-MC+. Como control positivo de amplificación con los oligonucleótidos ToV-Pol1b5'-3' se utilizó el vector pGT-pol1b.

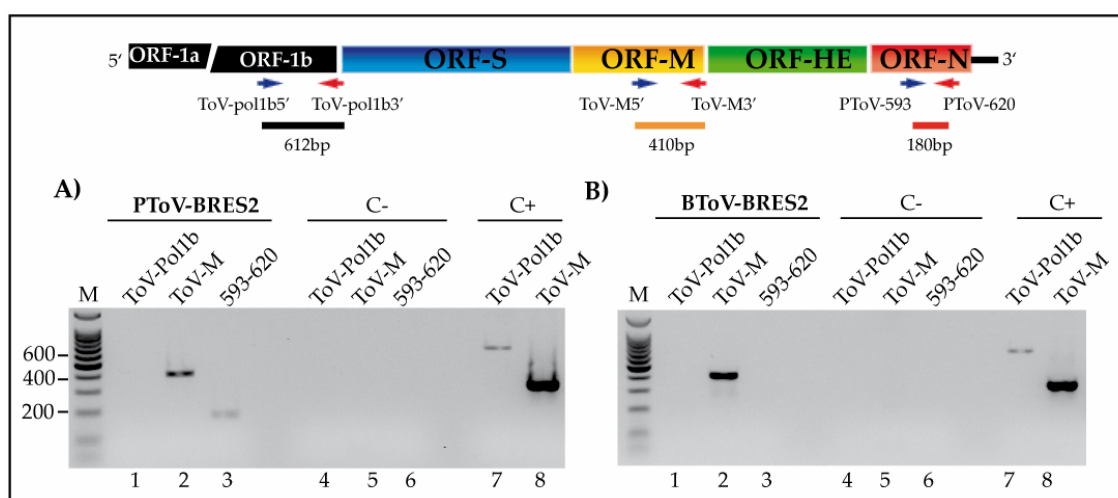


Figura 4. Detección por RT-PCR de los aislados de torovirus PToV-BRES2 (A) y BToV-BRES2 (B) en muestras de heces. A partir del RNA obtenido de las muestras de heces P-BRES2 y B-BRES2 se sintetizaron los cDNAs correspondientes (PToV-BRES2 y BToV-BRES2). Estos se utilizaron como moldes en las reacciones de PCR con los oligonucleótidos ToV-Pol1b5'-3' (ToV-Pol1b) (carriles 1), ToV-M5'-3' (ToV-M) (carriles 2) y 593-620 (carriles 3). Como control negativo (C-) se utilizó el RNA de cada muestra (carriles 4-6), y como controles positivos de amplificación se utilizaron los plásmidos pGT-pol1b (C+ ToV-Pol1b) y pGT-MC+ (C+ ToV-M) (carriles 7 y 8 respectivamente). En la parte superior de la figura se muestra esquemáticamente la posición en el genoma de los oligonucleótidos utilizados en este ensayo.

Mediante RT-PCR no se obtuvo ningún resultado positivo en las muestras de heces procedentes de las granjas españolas, ni en las muestras P-BRES 1 y P-BRES3. Sin embargo, como se muestra en la figura 4.A, a partir del cDNA obtenido de la muestra P-BRES2, se amplificó un fragmento de 410pb con los oligonucleótidos ToV-M5'-3' (carril 2) y un fragmento de 180pb con los oligonucleótidos 593 y 620 (carril 3), que es el tamaño esperado según lo descrito (Kroneman y col., 1998). Sin embargo, no se obtuvo amplificación con los oligonucleótidos ToV-Pol1b5'-3' (carril 1), lo que puede deberse a que las secuencias de los oligonucleótidos no estén conservadas en el caso de PToV. Hay que recordar que los

oligonucleótidos Pol1b, se diseñaron basándonos únicamente en las dos secuencias disponibles para la ORF1b de BEV y BToV.

Respecto a las muestras de heces de bovino procedentes de Brescia, se analizaron de la misma forma y como se observa en la figura 4.B, en la muestra B-BRES2 (carril 2) se amplificó un fragmento de 410 pb, con los oligonucleótidos ToV-M5'-3'. Sin embargo, no se obtuvo amplificación con los oligonucleótidos 593-620 (carril 3), lo que demuestra la especificidad para PToV de estos oligonucleótidos, ni con los oligonucleótidos ToV-Pol1b5'-3' (carril 1) lo que de nuevo, puede deberse a diferencias de secuencia en la región de los oligonucleótidos entre los aislados publicados y este nuevo aislado.

Para confirmar la especificidad de los fragmentos obtenidos en cada caso, estos se purificaron del gel, se clonaron en el vector pGemT (pGT-PToVBRES2-ToV-M, pGT-PToVBRES2-N593620 y pGT-BToVBRES2-ToV-M) y se secuenciaron utilizando los oligonucleótidos correspondientes a los promotores T7 y Sp6 presentes en el plásmido.

Como se observa en la figura 5, las secuencias del fragmento de 410 pb del gen M (Panel A) y de 180 pb del gen N (Panel B) de la muestra P-BRES2, quedan agrupadas con las secuencias de torovirus porcino. El porcentaje de homología entre el fragmento del gen M de P-BRES2 y el resto de los aislados porcinos fue del 95%, mientras que el porcentaje de homología con BEV y con los aislados de BToV fue del 81%. Estos porcentajes son equivalentes a los observados previamente entre las distintas cepas de PToV (95-97%) y frente a BEV y BToV (80-81%). Respecto al fragmento del gen N, la homología frente al resto de cepas de PToV fue del 86-89%. Frente a la mayoría de los aislados bovinos la homología fue del 85% y frente al aislado bovino BRV fue del 64%. Respecto a BEV la homología fue del 57%.

Por su parte, la secuencia del fragmento amplificado del gen M de la muestra B-BRES2, queda agrupada con las secuencias de BToV (Figura 5.C). Esta secuencia mostró una homología del 99% respecto a otros aislados bovinos, una homología del 80-81% respecto a los aislados porcinos, incluida la secuencia del fragmento amplificado de P-BRES2, y de un 81% respecto a BEV.

Estos resultados demuestran que los fragmentos amplificados tanto en la muestra de heces de lechón (P-BRES2) como en la muestra de heces de ternera (B-BRES2) corresponden a secuencias específicas de torovirus porcino y bovino, respectivamente y que además representan dos nuevos aislados de PToV, y de BToV, a los que hemos denominado como PToV-BRES2 y BToV-BRES2, respectivamente.

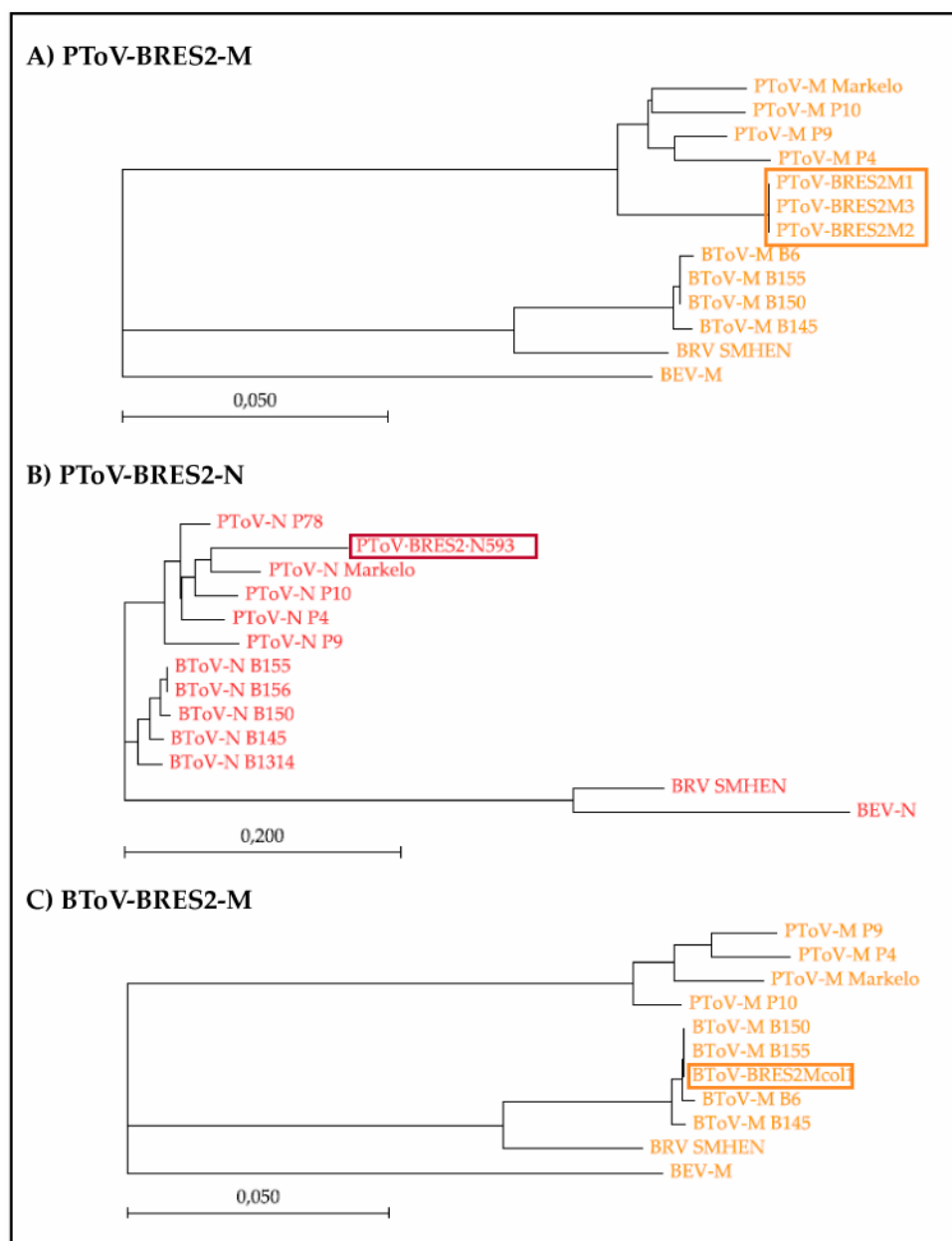


Figura 5. Análisis de las secuencias obtenidas mediante RT-PCR de las muestras de heces P-BRES2 y B-BRES2. El análisis filogenético de los fragmentos de los genes M (A) y N (B) de PToV-BRES2 y del gen M de BToV-BRES2 (C), se llevó a cabo mediante alineamientos con el algoritmo ClustalW y mediante árboles filogenéticos con el algoritmo *neighbour-joining*, con las secuencias disponibles en GenBank para los aislados descritos de PToV (P78, P10, P4, P9 y Markelo), BToV (B150, B155, B6, B145 y BRV) así como las secuencias de BEV. Las barras indican el número de sustituciones de nucleótidos por cada 100 nucleótidos.

Finalmente, estos resultados demuestran la validez de los oligonucleótidos ToV-M5'-M3' para la detección de torovirus en muestras de heces mediante RT-PCR y su versatilidad para el diagnóstico molecular de torovirus equino, porcino y bovino.

1.2.1. ANÁLISIS POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE LAS MUESTRAS DE HECES DE CERDO PROCEDENTES DE BRESCIA

Una vez hubimos diagnosticado por RT-PCR la muestra P-BRES2 como positiva para PToV, quisimos constatar la presencia de partículas virales mediante inmunomicroscopía electrónica en las muestras procedentes de Brescia, utilizando el suero porcino anti-BRES y siguiendo el protocolo descrito en el apartado 4 de materiales y métodos.

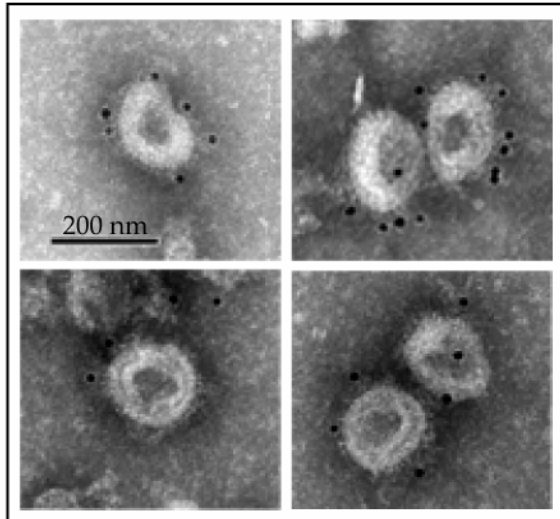


Figura 6. Inmunomicroscopía electrónica de la muestra P-BRES2. 50 µl de una dilución 1:2 en PBS de la muestra P-BRES2 se incubó durante 1h con una dilución 1:40 del suero anti-BRES. A continuación la mezcla se centrifugó sobre una rejilla de cobre utilizando un rotor Airfuge Beckman. Los anticuerpos se marcaron con proteína A acoplada con oro coloidal de 10nm y finalmente se llevó a cabo una tinción negativa con PTA al 2% y se visualizó la muestra en el microscopio electrónico.

Como se observa en la figura 6, en la muestra de heces P-BRES2, se observaron mediante inmunomicroscopía electrónica partículas virales marcadas específicamente con el suero anti-BRES y con una morfología ovalada que recuerda a los eritrocitos, descrita para los torovirus (Woode y col., 1982). El resto de muestras de heces de cerdo procedentes de Brescia no mostraron un resultado claro por microscopía electrónica. En la información remitida por el Dr. Lavazza ya se apuntaba este resultado, a pesar de lo cual se habían considerado positivas.

1.3. DESARROLLO DE UNA RT-PCR SEMIANIDADA (snRT-PCR) ESPECÍFICA PARA TOROVIRUS PORCINO

Una vez dispusimos de una muestra positiva para torovirus porcino, nos propusimos utilizarla como modelo para desarrollar un sistema de RT-PCR más sensible y específico para PToV mediante una estrategia de RT-PCR semianidada (snRT-PCR), utilizando oligonucleótidos conservados en los aislados descritos de PToV. Además, ya que en el laboratorio se están llevando a cabo otros estudios utilizando BEV como modelo, se decidió utilizar oligonucleótidos específicos para PToV para evitar así posibles contaminaciones cruzadas con BEV.

1.3.1. DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS Y OPTIMIZACIÓN DE LA snRT-PCR

Para diseñar los oligonucleótidos seleccionamos una región del gen N conservada en un 95% entre los aislados porcinos y sólo en un 70% en BEV. Diseñamos los oligonucleótidos PToV-NI1, PToV-NI2 y PToV-NE2 con secuencias específicas de PToV (ver apartado 9.2 de materiales y métodos). Los oligonucleótidos PToV-NI1-NE2 amplificarían un fragmento de 210pb del gen N en una primera reacción y los oligonucleótidos PToV-NI1-NI2 amplificarían un fragmento interno de 180pb en una segunda reacción en la que se utilizaría como molde el producto de la primera reacción (Figura 7.A).

La optimización del método de snRT-PCR la llevamos a cabo utilizando diluciones seriadas 1:10 del cDNA de PToV-BRES2 y probando diferentes temperaturas de hibridación y concentraciones de MgCl₂ para cada una de las reacciones de forma independiente. La temperatura de hibridación óptima para ambas combinaciones de oligonucleótidos fue de 50 °C y la concentración de MgCl₂ óptima fue de 1,5mM en las dos mezclas de reacción (Datos no mostrados).

1.3.2. COMPARACIÓN ENTRE EL MÉTODO DE RT-PCR SIMPLE Y DE snRT-PCR EN LA DETECCIÓN DE PToV EN HECES

Una vez optimizadas las condiciones de la snRT-PCR, quisimos evaluar si este método era efectivamente más sensible que el método de RT-PCR con los oligonucleótidos ToV-M5'-3'. Para ello, nuevamente utilizamos diluciones seriadas del cDNA de PToV-BRES2 y analizamos el límite de detección del método de RT-PCR simple con los oligonucleótidos ToV-M5'-3' y del método de snRT-PCR.

Como se observa en la figura 7.B, la sensibilidad por RT-PCR simple con ambas combinaciones de oligonucleótidos ToV-M5'-3' y PToV-NI1-NE2 fue equivalente tras la primera reacción de PCR, lo que implica que no hemos perdido sensibilidad al cambiar de oligonucleótidos. Además, se puede observar en la figura 7.C, como utilizando una estrategia de snRT-PCR podemos amplificar hasta una dilución 10⁻³ de la muestra de cDNA de PToV-BRES, mientras que tras la primera reacción sólo conseguimos amplificar hasta la dilución 10⁻¹. Estos resultados indican que el método de snRT-PCR desarrollado es 100 veces más sensible que el método de RT-PCR utilizando los oligonucleótidos ToV-M5'-3'. Además hemos comprobado que como preveíamos estos oligonucleótidos no amplifican el genoma de BEV (Datos no mostrados).

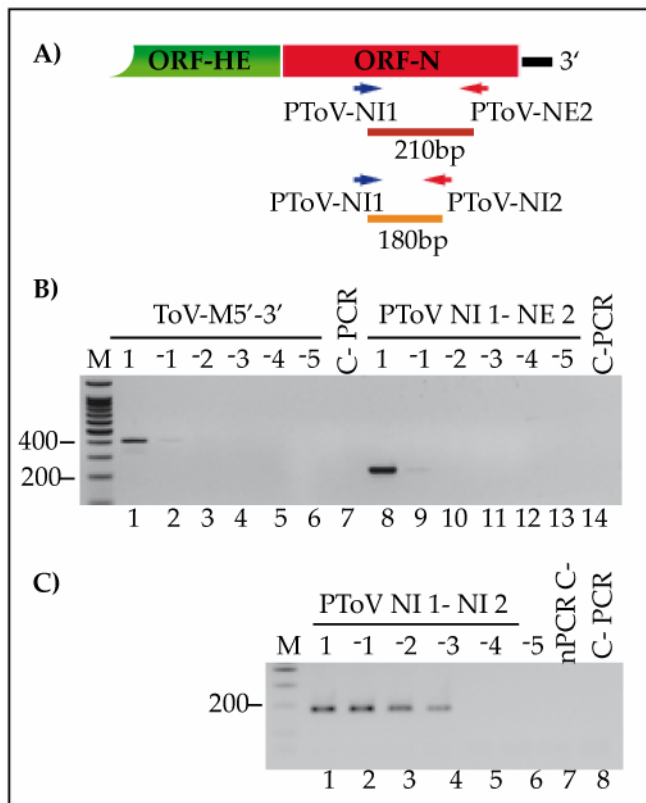


Figura 7. A) Esquema de los oligonucleótidos utilizados en la snRT-PCR. B) Análisis de la sensibilidad de los métodos de RT-PCR. Se utilizó el cDNA obtenido a partir del RNA de PToV-BRES2 sin diluir (1) o diluciones seriadas 1:10 del mismo (-1, -2, -3, -4, -5) para analizar la sensibilidad de los métodos de PCR con los oligonucleótidos ToV-M5'-3' y PToV-NI1-NE2. En todas las reacciones se llevaron en paralelo controles de agua (C- PCR). C) Análisis del límite de detección de la snRT-PCR tras la segunda reacción de PCR con los oligonucleótidos PToV-NI1-NI2. En la segunda reacción, además de un control negativo de agua (C-PCR), se utilizó como control negativo el producto del control negativo de agua de la primera reacción (nPCR C-). El resultado se visualizó en un gel de agarosa al 2%.

1.4. ANÁLISIS MEDIANTE snRT-PCR DE LA PRESENCIA DE TOROVIRUS EN HECES DE CERDO

Una vez establecidas las condiciones óptimas del ensayo, analizamos por snRT-PCR las muestras de heces de cerdo procedentes de las granjas españolas, así como, las procedentes de Brescia. Para descartar contaminaciones durante las extracciones de RNA, o durante la preparación del cDNA, utilizamos como controles negativos los RNA obtenidos a partir de cada muestra (C-), así como controles de agua tanto en las mezclas de reacción de transcripción reversa (RT c-), como en la de PCR (PCR c-). Además, para descartar contaminaciones sólo detectables tras la reamplificación, se utilizó como control negativo en la segunda reacción de PCR, el producto obtenido en el control de agua de la primera reacción (nPCR c-).

No se obtuvo amplificación por este método con las muestras procedentes de Brescia, P-BRES 1 y P-BRES3, sin embargo, tras analizar las 15 muestras de heces procedentes de granjas españolas, obtuvimos un resultado positivo en una muestra de heces procedente de una granja de Aragón (P-ZAR2). En la figura 8 se muestra el resultado obtenido en el análisis de las 4 muestras procedentes de la granja de Aragón (P-ZAR). Como se observa en la figura, la

amplificación sólo fue detectable tras la segunda reacción de amplificación (Figura 8.B, carril 2).

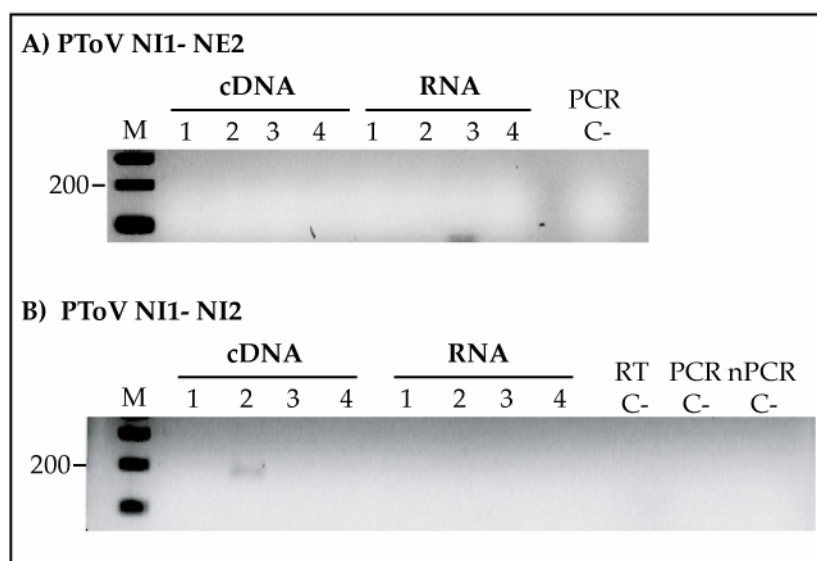


Figura 8. Detección por snRT-PCR de PToV en una muestra de heces. A) Primera reacción de RT-PCR con los oligonucleótidos PToV NI1-NE2 y **B)** Segunda reacción de amplificación con los oligonucleótidos PToV NI1-NI2. Como controles negativos se utilizaron el RNA obtenido de las distintas muestras de heces (RNA) y controles de agua en la reacción de RT (RT C-), en las dos reacciones de PCR (PCR C-) y de reamplificación (nPCR C-). El resultado se visualizó en un gel de agarosa al 2%.

El fragmento obtenido se purificó del gel y se secuenció. La secuencia de este fragmento mostró una homología del 88-89% respecto a las secuencias del fragmento del gen N correspondiente de las cepas de PToV P4, P9, P78 y la secuencia del gen N de PToV-BRES2 (capítulo 2). La mayor homología se observó con la cepa Markelo siendo ésta de un 94%. De los 3 cambios de nucleótidos únicos respecto a las secuencias del resto de aislados porcinos, solo la mutación en el nucleótido 58 (C→A) induce un cambio de aminoácido, de leucina a isoleucina. Aparte de esta mutación, el resto de cambios están presentes en otros aislados porcinos (Figura 9).

Estos resultados demuestran que el fragmento amplificado pertenece a un nuevo aislado de PToV, al que denominamos PToV-ZAR2, siendo éste el primer aislado de torovirus porcino que se detecta en una granja española.

Con el objetivo de confirmar este resultado, se intentaron amplificar otros fragmentos del genoma con los oligonucleótidos ToV-M5'-3', ToV-Pol1b5'-3' y la pareja 593 y 620, descritos antes. Tras dos reamplificaciones consecutivas con los mismos oligonucleótidos, no se obtuvo ningún resultado (Datos no mostrados), seguramente debido a la baja cantidad de virus en la muestra.

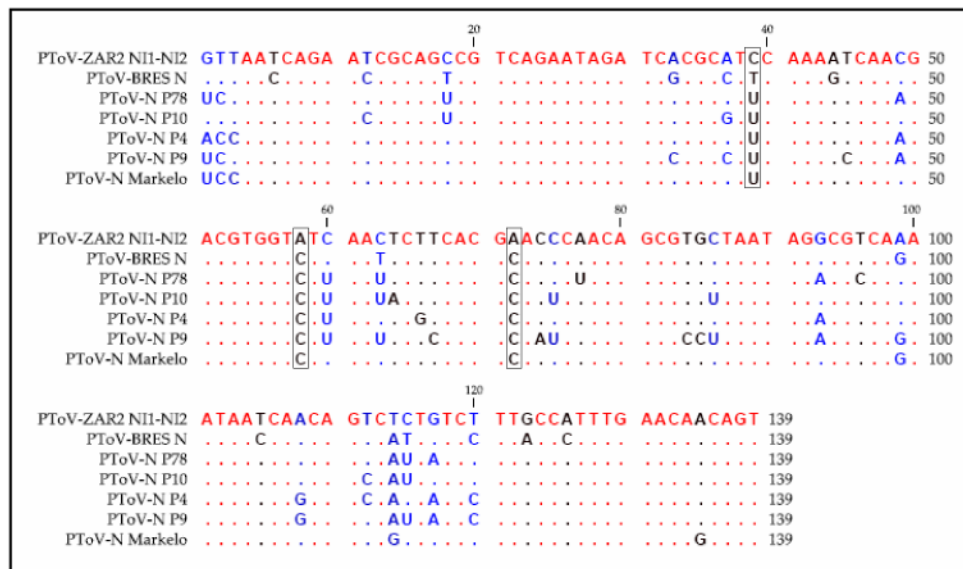


Figura 9. Alineamiento de la secuencia obtenida del fragmento N de PToV-ZAR2 respecto al resto de aislados porcinos. Los puntos indican nucleótidos conservados en las secuencias de los aislados porcinos respecto a PToV-ZAR2. En rojo se muestran los oligonucleótidos conservados en todos los aislados. En negro se muestran los oligonucleótidos conservados en un 90%, mientras que en azul se muestran los nucleótidos conservados en menos de un 80%. Los cambios de nucleótidos únicos para PToV-ZAR se indican con un recuadro.

El análisis por microscopía electrónica de la muestra de heces P-ZAR2, no fue concluyente ya que, aunque se observaron algunas estructuras que podrían corresponder con PToV, éstas no eran reconocidas por los anticuerpos del suero anti-BRES. Los resultados de la detección por RT-PCR sugieren un bajo título de virus en la muestra y por tanto sería lógico asumir, que una técnica mucho menos sensible como la microscopía electrónica, no diera un resultado positivo claro.

2. ANÁLISIS FILOGENÉTICO DEL AISLADO PToV-BRES2

A continuación, quisimos amplificar y clonar los genes completos de las proteínas estructurales de PToV con dos objetivos: por una parte caracterizar filogenéticamente los nuevos aislados de PToV, en función de las secuencias de sus genes y por otra parte expresar las proteínas de PToV en sistemas heterólogos.. Los estudios filogenéticos descritos hasta la fecha en la bibliografía acerca de torovirus porcino están restringidos únicamente a cinco cepas, por lo que para obtener información acerca de su evolución, es importante aportar el máximo número de secuencias completas de sus genes.

2.1. AMPLIFICACIÓN DE LAS SECUENCIAS CODIFICANTES DE LOS GENES M, HE Y N DE PToV-BRES2

Para amplificar los genes de las proteínas estructurales M, HE y N de PToV nos basamos en las secuencias disponibles en GenBank de los distintos aislados de PToV y se diseñaron las parejas de oligonucleótidos PToV-M5', PToV-M3'; PToV-HE5', PToV-HE3' y PToV-N5', PToV-N3' (Figura 10.A). Para amplificar el gen S, se diseñaron los oligonucleótidos PToV-S5' y PToV-S3', basándonos en las secuencias de BEV, de los aislados de BToV y de la cepa PToV-Markelo que es la única disponible para PToV (Figura 10.A). Para facilitar el posterior subclonaje de las secuencias codificantes se añadieron secuencias de reconocimiento para las enzimas de restricción *Bam*HI y *Xba*I, en los oligonucleótidos situados en los extremos 5' y 3' de los genes, respectivamente. Las secuencias de los distintos oligonucleótidos se describen en el apartado 6.3.1 de materiales y métodos. Para este objetivo se utilizó el aislado PToV-BRES2, ya que en esta muestra habíamos observado un mayor título viral que en el aislado PToV-ZAR2.

A partir del cDNA de PToV-BRES2, se amplificó un fragmento de 500pb con los oligonucleótidos PToV-N5' y N3' (Figura 10.B) y uno de 700pb con los oligonucleótidos PToV-M5' y M3' (Figura 10.B), correspondientes a los tamaños esperados para los genes N y M de PToV, respectivamente.

Utilizando los oligonucleótidos PToV-HE5' y PToV-HE3' no se obtuvo amplificación del gen HE. Dado que la región 5' del gen muestra una mayor variabilidad en los aislados descritos hasta el momento, decidimos sustituir el oligonucleótido PToV-HE5' y utilizar los oligonucleótidos ToV-M5' y PToV-HE3'. Utilizando esta estrategia se obtuvo un fragmento del tamaño esperado de 1700pb (Figura 10.B). Este fragmento se clonó en el vector pGemT (pGT-PToVBRES2-M3'HE) y se secuenció en los dos sentidos a partir de las secuencias de los promotores T7 y Sp6 del plásmido. La secuencia obtenida mostró que el fragmento de 1746pb contenía 440pb de la región 3' del gen M, una secuencia de 17 pb correspondiente a la región intergénica, con la secuencia consenso de la TRS de torovirus 5'-CACTTATCTTTAGA-3' e inmediatamente seguido el gen HE completo de 1281pb. A partir esta secuencia pudimos comprobar que el aislado PToV-BRES2 tenía una mutación única que correspondía con la última base situada en el extremo 3' del oligonucleótido PToV-HE5', lo que explica la ausencia de amplificación con este oligonucleótido. Para amplificar de forma independiente el gen HE completo diseñamos un nuevo oligonucleótido basándonos en la secuencia obtenida que denominamos PToV-BRES2-HE5'. A partir del cDNA amplificamos un nuevo fragmento de 1300pb (Figura 10.B) que correspondía con el tamaño esperado para el gen HE. En la figura

10.B se muestran los fragmentos obtenidos por PCR utilizando las combinaciones de oligonucleótidos descritos anteriormente.

Con los oligonucleótidos PToV-S5' y S3' no se obtuvo amplificación del gen S, seguramente debido a que uno de los dos oligonucleótidos, o bien ambos, no hibridaron en el genoma del aislado PToV-BRES2. Hay que recordar que estos oligonucleótidos fueron diseñados basándonos únicamente en las 3 secuencias disponibles para el gen S de BEV, BToV y el aislado Markelo de PToV.

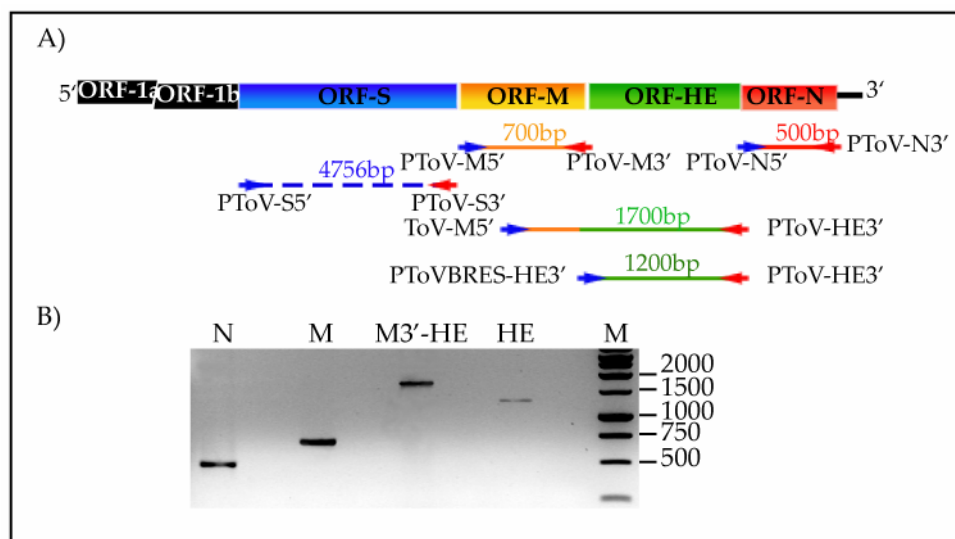


Figura 10. A) Esquema de la localización de los oligonucleótidos para la amplificación de los genes codificantes de las proteínas estructurales de PToV-BRES2 y B) amplificación de los genes N, M, HE y del fragmento 3' del gen M seguido del gen HE (M3'-HE). Como marcadores de peso molecular se utilizó una escala de DNA de 1000 pb (M). Los pesos moleculares de cada marcador se indican en pb.

Los fragmentos amplificados de los genes N, M y HE se clonaron en el vector pGemT generándose las construcciones pGT-PToVBRES2-N, pGT-PToVBRES2-M y pGT-PToVBRES2-HE. Los genes se secuenciaron en ambos sentidos utilizando los oligonucleótidos T7 y Sp6. Con las secuencias obtenidas a partir de los distintos clones se obtuvo una secuencia consenso para cada gen, que denominamos PToV-BRES2-N (-M, -HE) consenso.

2.2. ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS DE M, HE Y N DE PToV-BRES2

A partir de las secuencias obtenidas de los distintos clones de cada gen, se caracterizó filogenéticamente el aislado PToV-BRES2. El análisis se llevó a cabo mediante alineamientos múltiples con el programa informático MegAlign (DNASTar, Inc), de las secuencias obtenidas para cada gen con las de los aislados de torovirus descritos hasta la fecha y que están disponibles en la base de datos de GenBank.

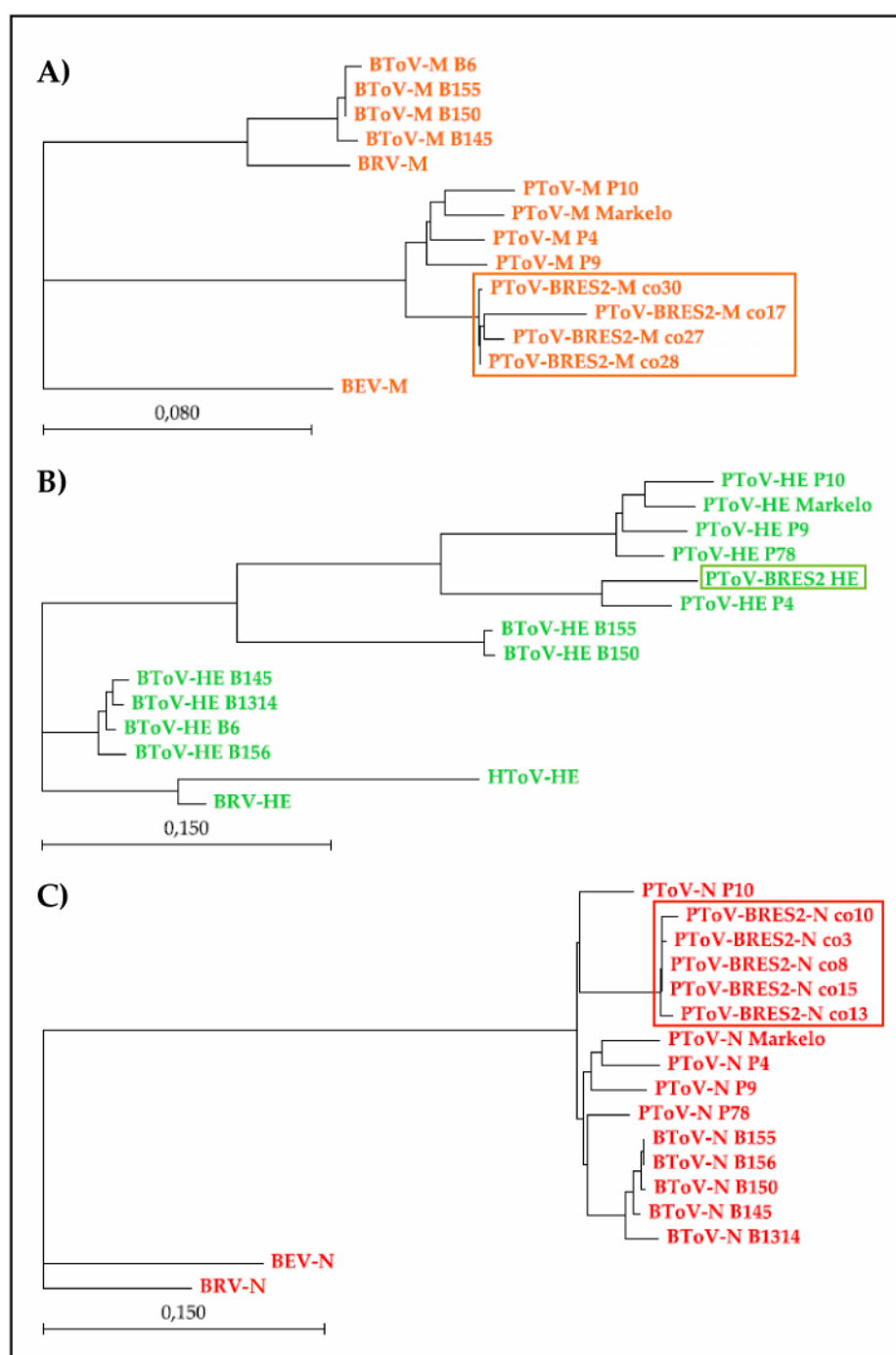


Figura 11. Árboles filogenéticos obtenidos para las ORFs M (A), HE (B) y N (C) de PToV-BRES2.

Para secuenciar el gen M se utilizaron 4 clones independientes. En la figura 11.A, se puede observar cómo las secuencias de los clones del gen M se agrupan junto con las secuencias de los torovirus porcinos, con una homología del 97-98% frente a un 89% de homología respecto a los aislados bovinos y a BEV.

Para generar la secuencia consenso del gen HE se utilizaron las secuencias de los 10 clones de la construcción pGT-PToVBRES2-M3'HE y los cuatro clones obtenidos tras la amplificación del fragmento correspondiente solo al gen HE. Estos clones mostraron secuencias idénticas a la secuencia consenso. Como se muestra en la figura 11.B la secuencia consenso del gen HE de PToV-BRES2 queda agrupada con la cepa P4 de PToV con un 92% de homología, frente a un 78-80% de homología respecto al resto de aislados porcinos. Respecto a BToV, la homología con las cepas B150 y B155 fue del 75%, mientras que, con las cepas BRV, B145, B156 y B1314 fue del 70-72%. Este mismo porcentaje se obtuvo respecto a la región del pseudo-gen HEX de BEV.

En el caso del gen N, los 5 clones obtenidos quedan agrupados con el resto de aislados porcinos con los que presenta un 91-93% de homología. La homología respecto a las cepas de BToV B145, B150, B155 y B156 y B1314 fue de un 91-93%, mientras que respecto al aislado bovino BRV fue solo de un 69%. Finalmente la homología frente al gen N de BEV, fue del 70% (Figura 11.C).

3. EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS M, HE Y N DE PToV-BRES2

Dado que por el momento no podemos crecer el virus PToV *in vitro*, nuestra opción más inmediata para el estudio de este virus es la expresión de las proteínas M, HE y N de PToV-BRES2 en sistemas heterólogos para poder caracterizarlas y purificarlas.

3.1. EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS M, HE Y N DE PToV EN CÉLULAS DE INSECTO MEDIANTE RECOMBINANTES DE BACULOVIRUS

Para la expresión de las proteínas de PToV-BRES2 utilizamos el sistema de expresión en células de insecto basado en la utilización de baculovirus recombinantes.

3.1.1. GENERACIÓN DE LOS BACULOVIRUS RECOMBINANTES PARA LAS PROTEÍNAS M, HE Y N DE PToV-BRES2

Los genes M, HE y N se clonaron en el vector comercial de generación de baculovirus recombinantes pFastBac HT, bajo el control del promotor temprano/tardío de la polihedrina de baculovirus y en fase con una secuencia del plásmido que codifica para una cola de seis histidinas. Para ello, los plásmidos pGT-PToVBRES2-M, pGT-PToVBRES2-HE y pGT-PToVBRES2-N (Figura 13) se digirieron con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Xba*I y los

genes M, HE y N de PToV se insertaron en el plásmido pFastBac HT, previamente digerido con las mismas enzimas. Así se obtuvieron las construcciones pFB-PToVBRES2-M, pFB-PToVBRES2-HE y pFB-PToVBRES2-N (Figura 12).

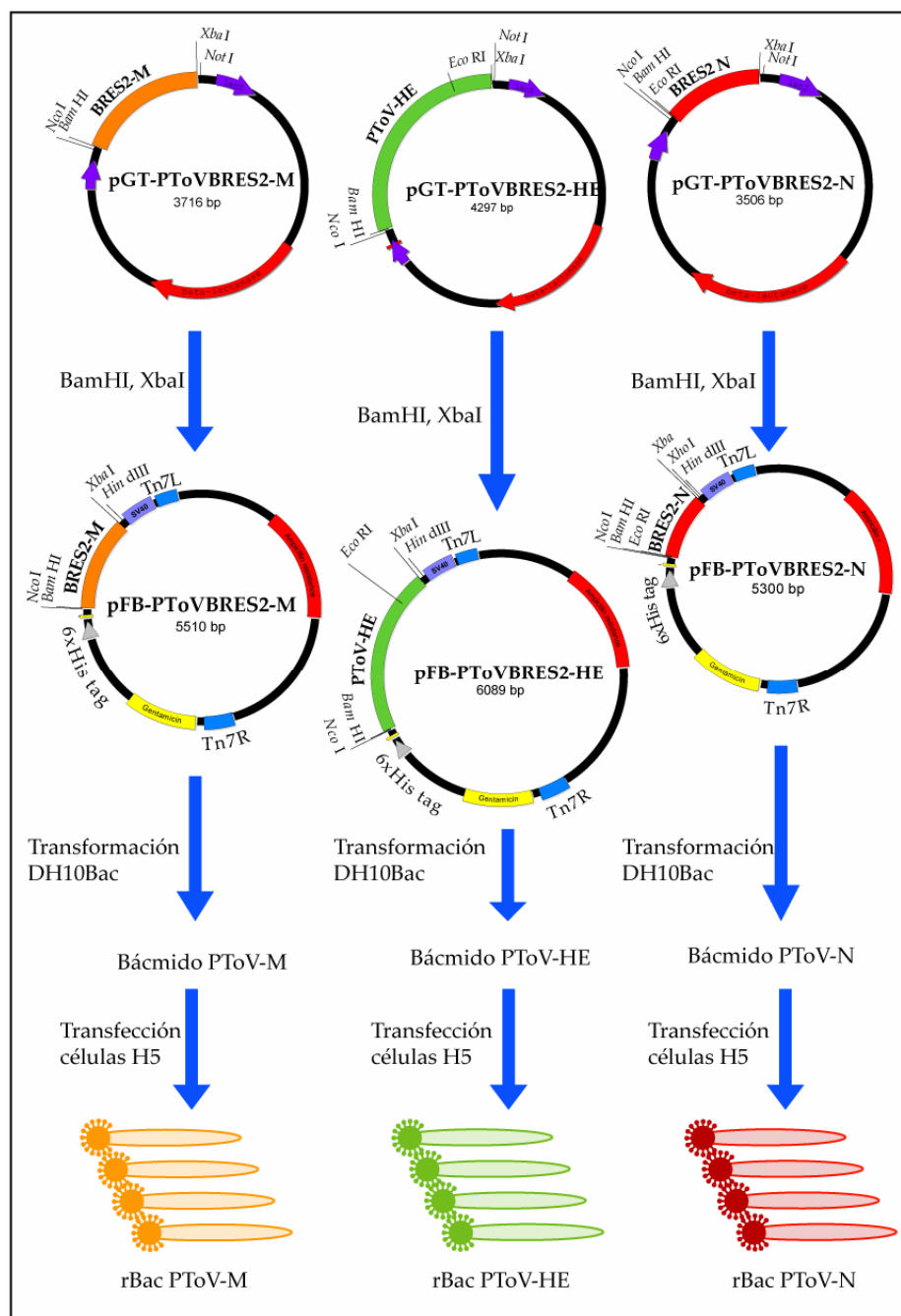


Figura 12. Esquema de construcción de los baculovirus recombinantes para las proteínas M, HE y N de PToV-BRES2.

Estas construcciones se utilizaron para la generación de los correspondientes baculovirus rBac-PToVBRES2-M, rBac-PToVBRES2-HE y rBac-PToVBRES2-N rBAC-PToV-M, mediante el procedimiento descrito en el apartado 7.1 de materiales y métodos.

3.1.2. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS M, HE Y N DE PTOV-BRES2 EN CÉLULAS DE INSECTO

Una vez generados los baculovirus recombinantes que expresan las proteínas M, HE y N de PToV, analizamos la cinética de expresión de éstas en células *HighFive*[®]. Para ello, $1,5 \cdot 10^5$ células se infectaron con cada uno de los virus recombinantes. A las 24, 48 y 72 hpi, se recogieron las células en tampón de carga de proteínas en ausencia de β -mercaptoetanol y se analizó la presencia de las proteínas mediante SDS-PAGE y tinción del gel con azul coomassie y mediante *western-blot*. Para el análisis por *western-blot* se utilizó el anticuerpo comercial anti-his y en el caso de las proteínas HE y N, se utilizó además el suero de cerdo anti-BRES, cedido por el Dr. Lavazza. Para la detección de la proteína M, se utilizó un anticuerpo generado en el laboratorio anti-BEV-M_{Nt}, que reconoce el extremo amino terminal de la proteína M de BEV.

3.1.2.1. EXPRESIÓN DE PTOV-M

En la figura 13, panel B, se muestra la reactividad del suero anti-his y del suero anti-M_{Nt} frente a una proteína de 23 kDa (▶) detectable a partir de las 48 hpi. También a partir de las 72 hpi se puede observar la acumulación de la proteína M sobre el fondo de proteínas celulares mediante tinción con azul de coomassie (Figura 13, panel A). El peso molecular teórico de la proteína M de PToV es de 26 kDa y contando con la cola de histidinas, el peso total teórico de la proteína sería de 29 kDa. Sin embargo, previamente se ha descrito que el carácter altamente hidrofóbico de la proteína M de BEV hace que su movilidad electroforética corresponda a la de una proteína de 22 kDa (Den Boon y col., 1991).

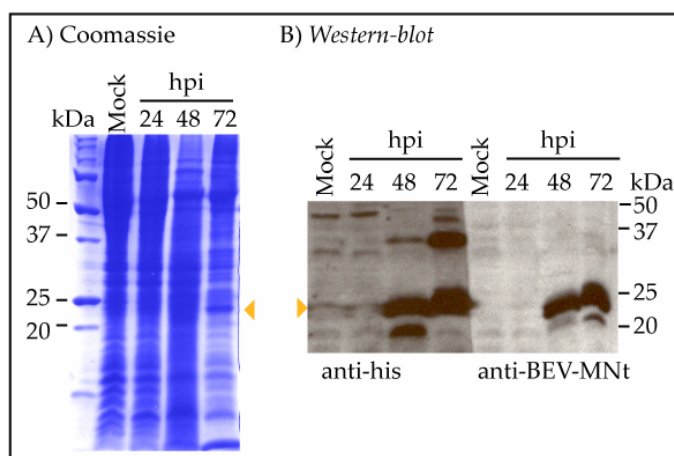


Figura 13. Expresión de la proteína M de PTOV-BRES2 en células de insecto. Se infectaron células *HighFive*[®] con el virus recombinante rBac-PToV-M y se recogieron a distintos tiempos post-infección (24, 28 y 72 hpi). Los extractos celulares se analizaron mediante SDS-PAGE y **A)** tinción con azul coomassie y **B)** *western-blot* con los sueros anti-his y anti-BEV-M_{Nt}. La posición de la proteína M se indica con ▶.

3.1.2.2. EXPRESIÓN DE PTOV-HE

En la figura 14.B, se observa la reactividad de los sueros anti-his y anti-BRES en muestras de células infectadas con el baculovirus recombinante rBac-PToV-HE. Ambos sueros

reconocen una proteína de 65 kDa (▶) a las 24, 48 y 72 hpi, y a las 48 y 72 hpi se detectaron además proteínas de 120 y 250 kDa (▶) con ambos sueros. El peso molecular teórico de la proteína HE recombinante es de 51 kDa, 48 kDa correspondiente a la proteína HE y 3kDa más de la cola de histidinas. Sin embargo, se ha descrito que la proteína HE de torovirus está glicosilada (Cornelissen y col., 1997) y que el peso molecular de la forma glicosilada es de 65 kDa. Por lo tanto, la proteína de 65 kDa detectada en los extractos de células de insecto correspondería a la forma glicosilada. Por su parte las bandas de 120 kDa y de 250 kDa podrían corresponder a formas oligoméricas de la proteína HE.

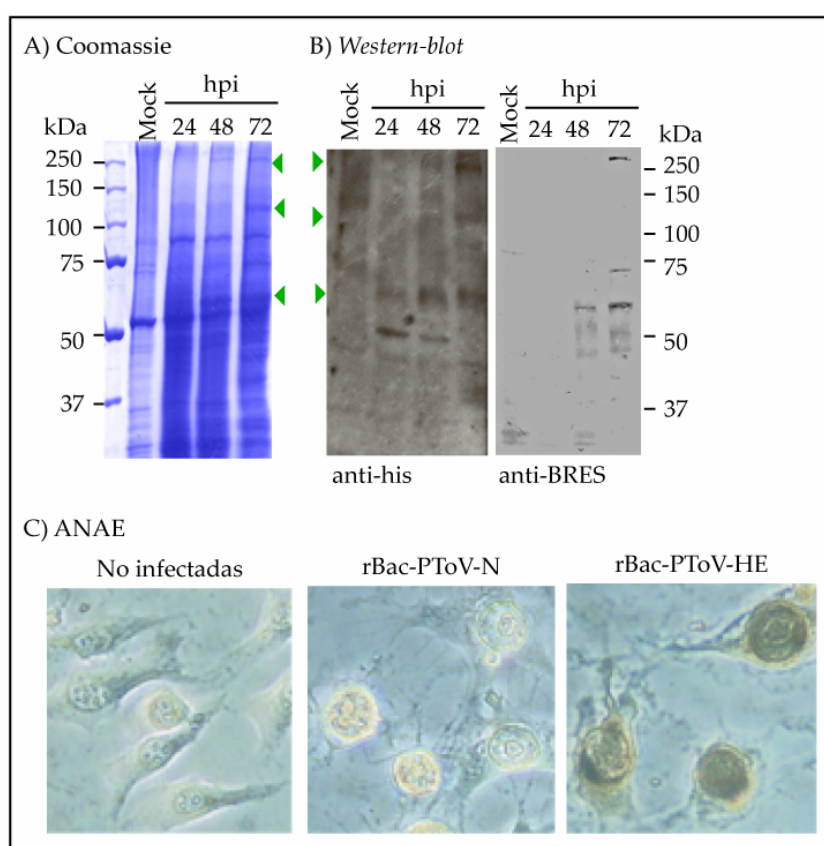


Figura 14. Expresión de la proteína HE de PToV-BRES2 en células de insecto. Se infectaron células *HighFive*® con el virus recombinante rBac-PToV-HE y se recogieron a distintos tiempos postinfección (24, 48 y 72 hpi). Los extractos celulares se analizaron mediante SDS-PAGE y tinción con azul coomassie (A) y *western-blot* (B) con los sueros anti-his y anti-BRES. Las posiciones de las distintas formas de la proteína HE se indican con ▶. C) Análisis de actividad acetilesterasa de la proteína HE de PToV, mediante un ensayo con α -naftil acetato (ANAE) en células sin infectar o infectadas con los baculovirus recombinantes rBac-PToV-N y rBac-PToV-HE.

La proteína HE de torovirus se ha descrito como una enzima acetilesterasa (Cornelissen y col., 1997). Por ello para comprobar si la proteína HE de PToV-BRES2 expresada en las células

de insecto mantenía su funcionalidad, analizamos su actividad enzimática mediante un ensayo de α -naftilacetato (ANAE). Para este ensayo, se infectaron a alta multiplicidad monocapas de células *HighFive*[®] subconfluentes con el baculovirus recombinante, rBac-PToVBRES2-HE o con el recombinante rBac-PToVBRES2-N, como control negativo de una proteína sin actividad acetilesterasa. Además se analizó la actividad esterasa basal en células de insecto no infectadas. A las 48hpi, se retiró el medio de cultivo y se llevó a cabo el experimento según se describe en el apartado 7.7 de materiales y métodos. El resultado se visualizó en el microscopio óptico.

Como se observa en la figura 14, panel C, en las células infectadas con el virus rBac-PToV-HE el sustrato sintético de esterases, α -naftilacetato, es degradado por la proteína HE, mediante su actividad esterasa, liberando α -naftol, que precipita formando cúmulos coloreados en los lugares donde tiene lugar la reacción. No ocurre así en las células sin infectar, ni en aquellas células infectadas con el virus rBac-PToV-N. Este resultado demuestra que la proteína HE se expresa en células de insecto mediante el virus recombinante rBac-PToVBRES2-HE y conserva su actividad acetilesterasa.

3.1.2.3. EXPRESIÓN DE PToV-N

Como se observa en la figura 15, panel B, en células infectadas con el virus rBAC-PToV-N, tanto el suero anti-his como el suero de cerdo anti-BRES, reconocen por *western-blot* una proteína mayoritaria de 20kDa (♦), que se acumula en las células y desde las 48hpi, se puede observar mediante tinción con azul de coomassie sobre el fondo de proteínas celulares (Figura 13, panel A). La proteína N de PToV tiene un peso molecular de 16kDa por lo que fusionada a la cola de histidinas (3kDa) el tamaño final de la proteína recombinante sería de 20 kDa, que coincide con el observado.

También se observan proteínas de un peso molecular inferior a 20 kDa que podrían corresponder a productos de degradación, así como una proteína de aproximadamente 22 kDa que también es reconocida por los dos sueros. En estudios previos se ha descrito la proteína N de BEV (Horzinek y col., 1985) como una proteína de 20 kDa fosforilada. Además, en ensayos previos del laboratorio se ha observado que la proteína N de BEV, expresada en células de insecto mediante baculovirus recombinantes, se fosforila en residuos de serina y treonina. Las proteínas N de BEV y PToV poseen el mismo número de residuos Ser (13) y Thr (7) susceptibles de ser fosforilados. Por lo tanto, la proteína de 20kDa podría corresponder a la forma no fosforilada de la proteína N, mientras que la proteína de 22kDa correspondería a la forma fosforilada.

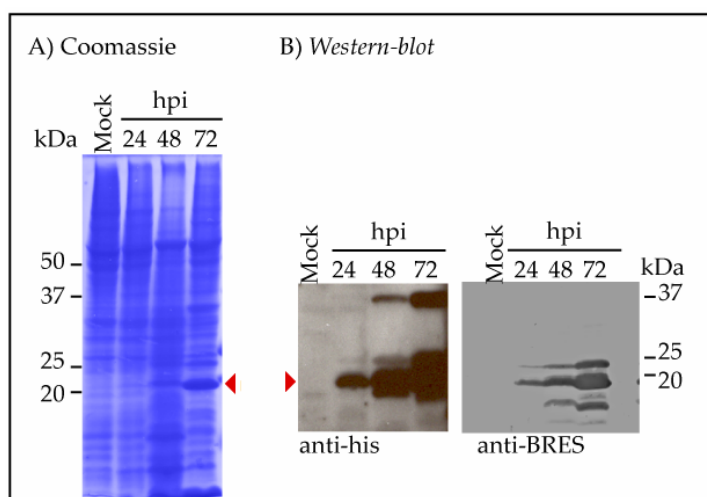


Figura 15. Expresión de la proteína N de PToV-BRES2 en células de insecto. Se infectaron células *HighFive*[®] con el virus recombinante rBac-PToV-N y se recogieron a distintos tiempos postinfección (24, 28 y 72 hpi) y los extractos celulares se analizaron mediante SDS-PAGE y A) tinción con azul de Coomassie y B) *western-blot* con los sueros anti-his y anti-BRES. La posición de la proteína M se indica con ▶.

3.2. PURIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS M, HE Y N

A continuación quisimos purificar cada una de las proteínas recombinantes de PToV mediante cromatografía de afinidad para lo que utilizamos una resina de cobalto comercial que tiene afinidad por los residuos de histidinas incorporadas en las proteínas recombinantes.

Las proteínas recombinantes M, HE y N resultaron ser insolubles tras el tratamiento con diferentes detergentes como NP-40 al 0,2%, Tritón-X100 al 0,1%, Tween20 al 0,1% o SDS 0,2%. Debido a ello para la purificación de las proteínas de PToV utilizamos un protocolo utilizado anteriormente en el laboratorio para la purificación de la proteína N de BEV y que se describe en el apartado 8.4 de materiales y métodos. Se utilizó dicho protocolo para purificar las proteínas de M, HE y N a partir de 30 placas de 150mm de diámetro de células *HighFive*[®] infectadas con 5 ufp/cél del virus recombinante correspondiente. Una vez purificadas se cuantificó la cantidad total obtenida para cada una de las proteínas mediante un ensayo de BCA. El rendimiento de los procesos de purificación se expresó como la cantidad de proteína obtenida por millón de células.

En la figura 16.A se muestra como ejemplo la purificación de la proteína N. Como se observa en la figura la proteína N eluye principalmente tras la primera incubación con el agente competidor imidazol. Así mismo, se observa que la proteína N se purifica como dos formas de 20 kDa y 22 kDa, que como habíamos visto anteriormente son reconocidas por el suero anti-his y el suero de cerdo anti-BRES (Figura 15). El rendimiento de la purificación fue aproximadamente de 20µg por 10⁶ células.

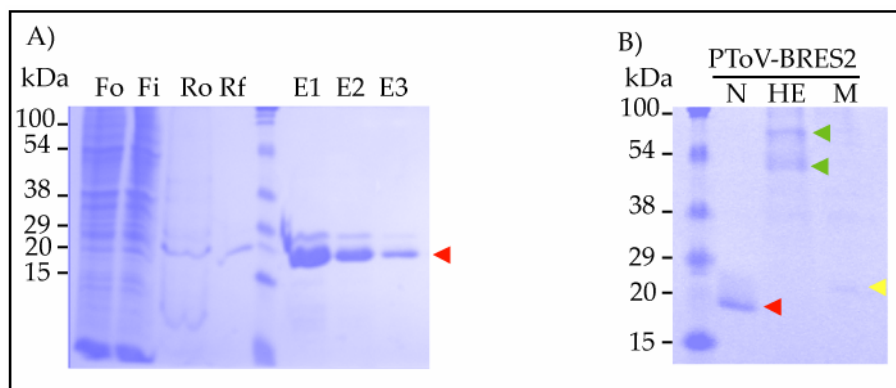


Figura 16. Purificación de las proteínas recombinantes M, HE y N de PToV-BRES2.

A) Análisis por SDS-PAGE y tinción con azul de coomassie de los distintos pasos de la purificación de la proteína N. Extracto celular inicial (Fo), fracción insoluble (Fi) y resina antes (Ro) y después de las eluciones (Rf) y eluciones de la proteína (E1, E2, y E3). B) Análisis por SDS-PAGE y tinción con azul de coomassie de las proteínas N (◄), HE (◄) y M (◄) purificadas.

En la figura 16.B, se observa que la proteína HE se purifica en dos formas de 50 y 65 kDa, que corresponderían con las formas glicosilada y no glicosilada de la proteína, observadas previamente por *western-blot* (Figura 14). El rendimiento de la purificación de la proteína HE fue de 2µg por 10⁶ células considerando las dos formas de la proteína. Para confirmar la identidad de las bandas, se cortaron del gel y se secuenciaron mediante espectrometría de masas acoplada a una trampa iónica. En ambas muestras se detectaron dos péptidos cuyas secuencias se correspondían con los residuos 47-67 y 102-113 de la proteína HE de torovirus porcino. Sin embargo, en la banda de 65kDa se detectó además la presencia de un péptido cuya secuencia se correspondía con la proteína de membrana de baculovirus.

En la figura 16.B se muestra la proteína M de PToV purificada. La cantidad que se obtuvo fue muy baja, con un rendimiento del orden de 0,01 µg por 10⁶ células.

Una vez purificadas y cuantificadas, las proteínas se dializaron frente a H₂O mQ para eliminar el imidazol y la urea presentes en el tampón de elución y se liofilizaron. Se observó que a medida que disminuía la cantidad de urea durante la diálisis se iban formando agregados insolubles de proteína por lo que finalmente las proteínas se resuspendieron en una solución de urea 8M.

3.3. GENERACIÓN DE ANTICUERPOS FRENTE A LAS PROTEÍNAS N Y HE DE PToV-BRES2

Una vez purificadas las proteínas de PToV-BRES2, quisimos generar anticuerpos contra las proteínas N y HE. La proteína M no se utilizó para generar sueros en animales de

laboratorio ya que el rendimiento del método de purificación no nos permitió obtener suficiente cantidad de proteína como para inocular animales y por otra parte, en el laboratorio ya disponemos de anticuerpos monoepitópicos (anti-BEV-M_{Nt}) que reconocen la proteína M de PToV-BRES2 (Figura 13), como ya se mostró anteriormente.

3.3.1. OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS FRENTE A LA PROTEÍNA N DE PToV-BRES2

Para generar el suero frente a la proteína N inoculamos en conejos una primera dosis de 500 µg de proteína diluida en PBS, seguida de tres dosis de recuerdo con 250 µg de inóculo. Se recogieron muestras de suero 10 días después de cada inoculación.

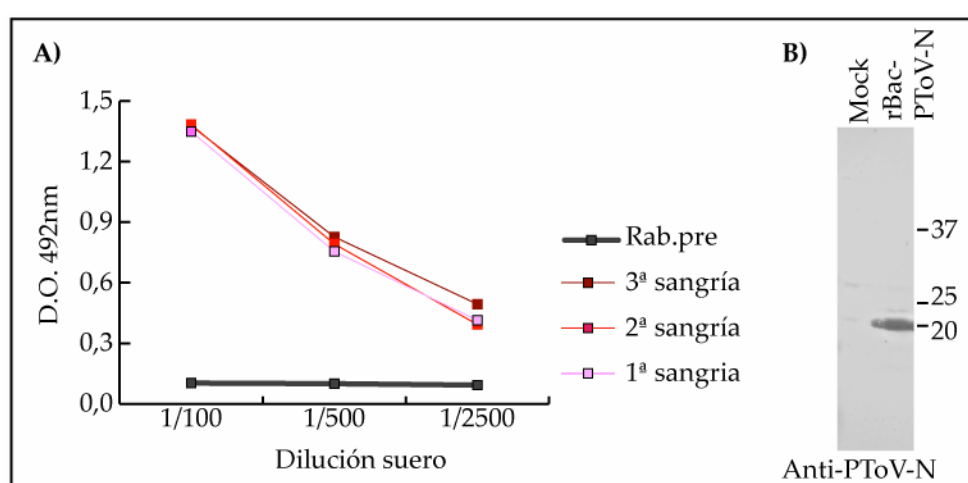


Figura 17. Análisis del suero anti-PToV-N frente a la proteína N. A) Se analizó mediante ELISA la evolución del título de anticuerpos tras cada una de las inoculaciones de recuerdo. Como control negativo se utilizó el suero previo a las inoculaciones (Rab. Pre). B) Análisis mediante *western-blot* de la especificidad de los anticuerpos frente a la proteína N en un extracto de células *HighFive*® infectadas con el virus rBac-PToV-N y recogidas a las 24 hpi.

La evolución del título de anticuerpos frente a la proteína N, tras las sucesivas inoculaciones, se determinó mediante ELISA frente a 50ng de proteína N purificada. Como control negativo se utilizó el suero del conejo extraído antes de la primera inoculación (Rab. pre). Como se observa en la figura 17, el título de anticuerpos no varió tras las tres inoculaciones del antígeno. Además, se comprobó la especificidad de los anticuerpos mediante *western-blot* (Figura 17.B) utilizando extractos de células *HighFive*® infectadas con el virus rBac-PToV-N o sin infectar.

3.3.2. OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS FRENTE A LA PROTEÍNA HE DE PToV-BRES2

Para la obtención de anticuerpos frente a la proteína HE decidimos inocular únicamente la proteína de 50 kDa dado que, como se ha comentado anteriormente, la banda de 65 kDa contiene trazas de una proteína contaminante de baculovirus. Para ello, cargamos 500 µg de

proteína total en un gel de poliacrilamida y tras la separación de las proteínas, se cortó la banda correspondiente a 50 kDa, se trituró en presencia de PBS, y la suspensión obtenida se inoculó en un conejo siguiendo la pauta de inoculaciones descrita en materiales y métodos. Se analizó por *western-blot* la reactividad frente a la proteína HE del suero obtenido frente a la proteína purificada y frente a extractos de células infectadas con rBac-PToV-HE, pero no observamos reactividad específica frente a la proteína en ninguno de los sueros obtenidos. Por ello decidimos descartar estos sueros, y cambiar de estrategia para la generación de sueros frente a la proteína HE.

Decidimos utilizar péptidos sintéticos correspondientes a la proteína HE de PToV-BRES2. A partir del análisis de la secuencia y de la predicción de regiones antigénicas mediante el programa informático Protean (DNASTar, Inc.), seleccionamos los péptidos 286E1 y 286F1. El péptido 286E1, corresponde a los residuos 50-66 de la proteína y es, por lo tanto, una región adyacente al centro catalítico de la actividad esterasa de la proteína (ver introducción, página 11). Por su parte, el péptido 286F1, corresponde al dominio de unión al receptor situado entre los residuos 150 y 160. Estos péptidos, una vez acoplados a la proteína KLH, fueron utilizados para inmunizar un conejo siguiendo la pauta de inoculaciones descrita en materiales y métodos.

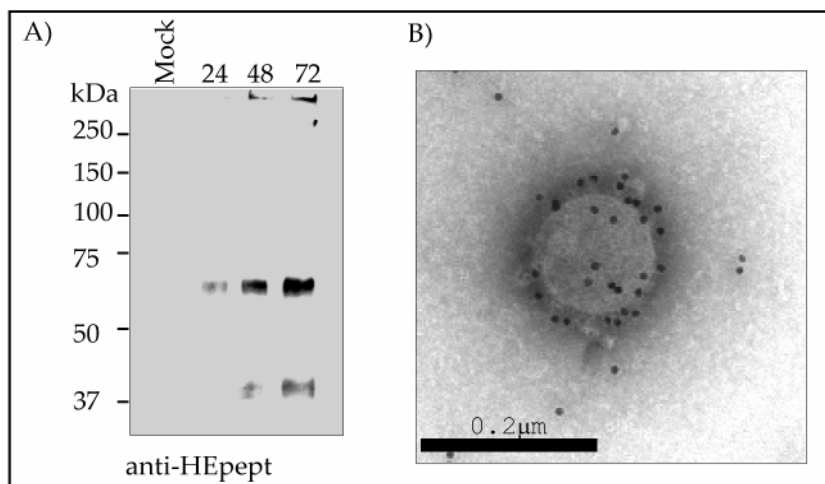


Figura 18. Análisis del suero anti-HEpept. A) *western-blot* con el suero anti-HEpept diluido 1:1000 frente a extractos de células *HighFive*® infectadas con el virus rBac-PToV-HE y recogidas a distintos tiempos postinfección. B) Detección de la proteína HE en la superficie de la partícula viral de PToV-BRES2 mediante inmunomicroscopía electrónica.

La especificidad de los anticuerpos frente a la proteína HE se analizó por *western-blot* (Figura 18.A) frente a extractos de células *HighFive*® infectadas con el baculovirus recombinante rBac-PToV-HE recogidos a diferentes tiempos post-infección (24, 48 y 72 hpi). Como se observa en la figura 18.A, los anticuerpos generados contra los péptidos 286E1 y

286F1 reconocen la proteína de 65 kDa que habíamos observado anteriormente con los sueros anti-his y anti-BRES y no se observa reacción alguna en el extracto de células sin infectar (Mock). Asimismo, se observa la acumulación de proteína a partir de la 24hpi así como la presencia de oligómeros de alto peso molecular a partir de la 48 hpi.

Además analizamos mediante microscopía electrónica la reactividad del suero anti-HEpept frente al virus PToV-BRES2, siguiendo el procedimiento utilizado anteriormente (ver apartado 1.2.1 de resultados). Como se observa en la figura 18.B, los anticuerpos generados frente a los péptidos sintéticos de HE, fueron capaces de reconocer la proteína HE en la superficie de la partícula viral.

3.4. CARACTERIZACIÓN DE LA PROTEÍNA HE EN CÉLULAS DE MAMÍFERO MEDIANTE UN RECOMBINANTE DEL VIRUS VACCINIA

Como se ha mostrado anteriormente, la proteína HE de PToV queda expuesta en la superficie de la partícula y es reconocida por un suero de cerdo (anti-BRES), por lo tanto la proteína HE podría ser utilizada como antígeno en un ensayo de detección de anticuerpos frente a PToV. Sin embargo, se ha descrito anteriormente que las células de insecto *HighFive*[®] tienen un patrón de glicosilación distinto al de las células de mamífero (Altmann y col., 1999), por ello debido a la importancia de obtener una proteína antigénicamente lo más parecida posible a la del virus, decidimos cambiar de sistema de expresión y expresar la proteína en células de mamífero mediante la generación de un virus vaccinia recombinante.

A partir de la construcción pGT-PToVBRES2-HE, subclonamos el gen HE en el vector de transferencia para el virus vaccinia pJR101, mediante digestión de ambos plásmidos con las enzimas *Bam*HI y *Nco*I y la posterior ligación en el vector pJR101. De esta forma se generó la construcción pJR-PToVBRES2-HE, en la que el gen HE queda bajo control de un promotor sintético temprano/tardío. Este plásmido se utilizó para transfectar células BSC40 que habían sido previamente infectadas con el virus vaccinia WR y de esta forma, mediante recombinación homóloga en la región de la hemoaglutinina de vaccinia, se generó el virus recombinante que expresa la proteína HE de PToV-BRES2, al que denominamos rVV-HE.

3.4.1. MODIFICACIONES POST-TRADUCCIONALES DE LA PROTEÍNA HE DE PToV-BRES2

Una vez obtenido el virus rVV-HE, quisimos analizar las modificaciones post-traduccionales de la proteína HE recombinante. En primer lugar quisimos estudiar la

glicosilación de la proteína. Para ello, se infectaron células BSC40 con el virus rVV-HE a alta multiplicidad (5ufp/célula) y se incubaron en presencia o en ausencia del inhibidor de la ruta de glicosilación, tunicamicina. Las células se recogieron a las 24hpi en tampón de carga de proteínas con y sin el agente reductor β -mercaptoetanol. Las proteínas se separaron mediante SDS-PAGE y se analizó la expresión de la proteína HE mediante *western-blot* utilizando los sueros de cerdo anti-BRES, una mezcla de sueros de cerdos comercial, que denominamos Serotec (Ver materiales y métodos) y el suero de conejo anti-HEpept. Como controles negativos se analizaron en paralelo células BSC40 infectadas con el virus WR.

Como se observa en la figura 19.A, el suero generado contra los dos péptidos de HE (anti-HEpept) reconoce específicamente la proteína de 65 kDa en los extractos de células infectadas con el virus rVV-HE analizados en condiciones reductoras (carril 8) mientras que en condiciones no reductoras la proteína muestra una movilidad ligeramente mayor (carril 4) lo que sugiere la presencia de puentes disulfuro intramoleculares. Cuando se analiza la proteína en extractos de células tratadas con tunicamicina, tanto en condiciones reductoras como no reductoras, se observa una disminución en el tamaño de la proteína de aproximadamente 15 kDa (carriles 3 y 7), por lo que asumiendo que cada cadena de N-glicosilación aporta 2kDa al peso molecular de la proteína, podemos extrapolar que la proteína HE de PToV está glicosilada en 7-8 sitios. Los sueros de cerdo anti-BRES y Serotec también reconocieron la proteína HE en su forma glicosilada y en condiciones no reductoras (carriles 2, en los paneles B y C, respectivamente). Sin embargo, no podemos afirmar que la reconozcan en su forma no glicosilada ya que a la altura a la que esperaríamos ver la banda de la proteína (carriles 1 en los paneles B y C, respectivamente) aparecen bandas inespecíficas que se observan también en los extractos de células infectadas con el virus parental WR (carriles 3 y 4 en los paneles B y C).

En la figura 19.A, también se puede observar en condiciones no reductoras la presencia de bandas que por su peso molecular podrían corresponder con formas dimericas y oligoméricas de la proteína, que no se observan en condiciones reductoras, lo que sugiere, que la proteína HE puede formar dímeros y multímeros mediante puentes disulfuro intermoleculares. Además, este resultado también se obtiene en presencia de tunicamicina (Figura 19.A, carril 3) lo que excluye la posibilidad de que estos dímeros se deban a interacciones entre las cadenas de glicosilación. Este resultado también se observó durante la expresión de la proteína HE en células de insecto (Figura 14.B). Sin embargo, en trabajos anteriores de caracterización de la proteína HE de BToV no se habían observado la formación de puentes disulfuro (Cornelissen y col., 1997). Dada esta discrepancia y teniendo en cuenta que las proteínas HE de los

coronavirus del grupo 2 forman dímeros por puentes disulfuro (Kienzle y col., 1990), decidimos profundizar en este análisis.

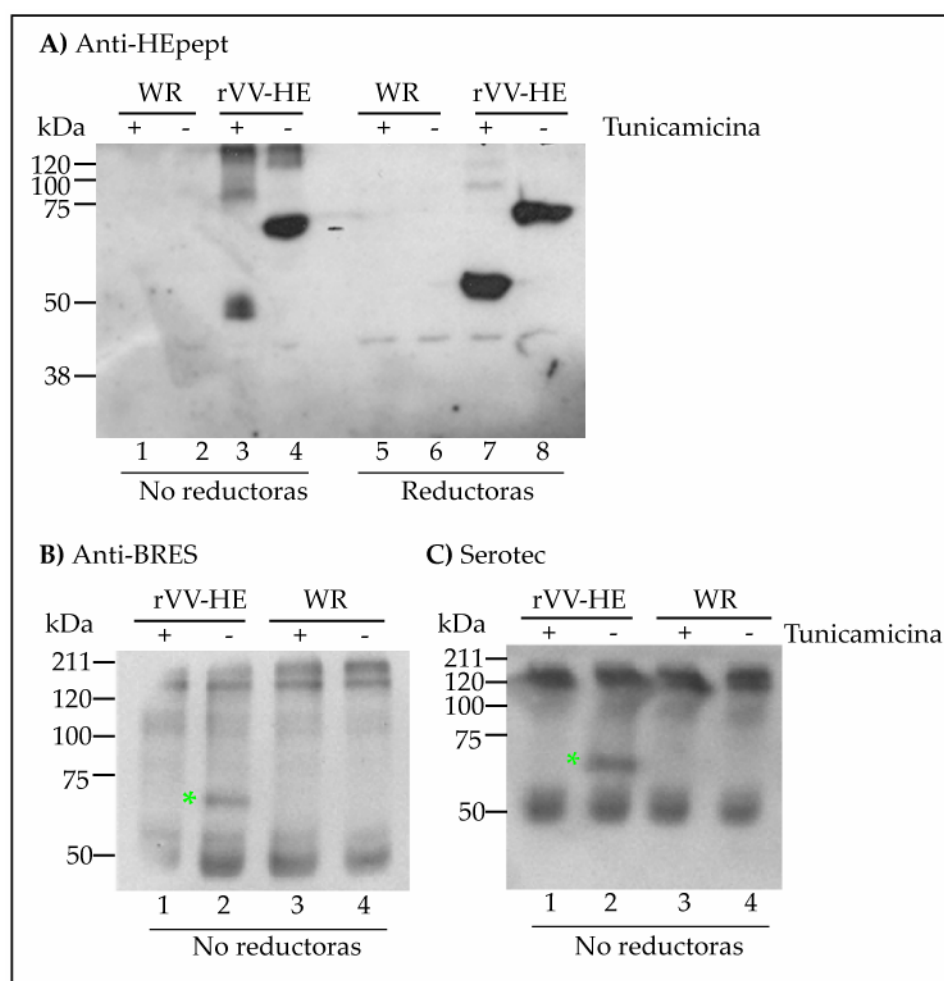


Figura 19. Expresión de la proteína HE de PToV-BRES2 en células de mamífero infectadas con el virus rVV-HE. Células BSC40 infectadas con el virus rVV-HE o WR en presencia (+) o en ausencia (-) de tunicamicina se recogieron a las 24 hpi y se analizaron mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras y no reductoras. Las proteínas transferidas a membranas de nitrocelulosa se incubaron con los sueros anti-HEpept (A) y los sueros de cerdo anti-BRES (B) y Serotec (C). El asterisco señala la proteína HE glicosilada detectada por los sueros porcinos.

En primer lugar, para descartar que los oligómeros de proteína HE detectados por *western-blot* se debieran a artefactos producidos durante la toma de las muestras, tratamos las células infectadas con el virus rVV-HE (24 hpi) con diferentes concentraciones del reactivo N-etilmaleimida (NEM) antes de recogerlas de la placa. El reactivo NEM reacciona con los grupos sulfhidrilo libres para formar un enlace tioeter estable, de forma que al recoger las células no se formarían nuevos puentes disulfuro.

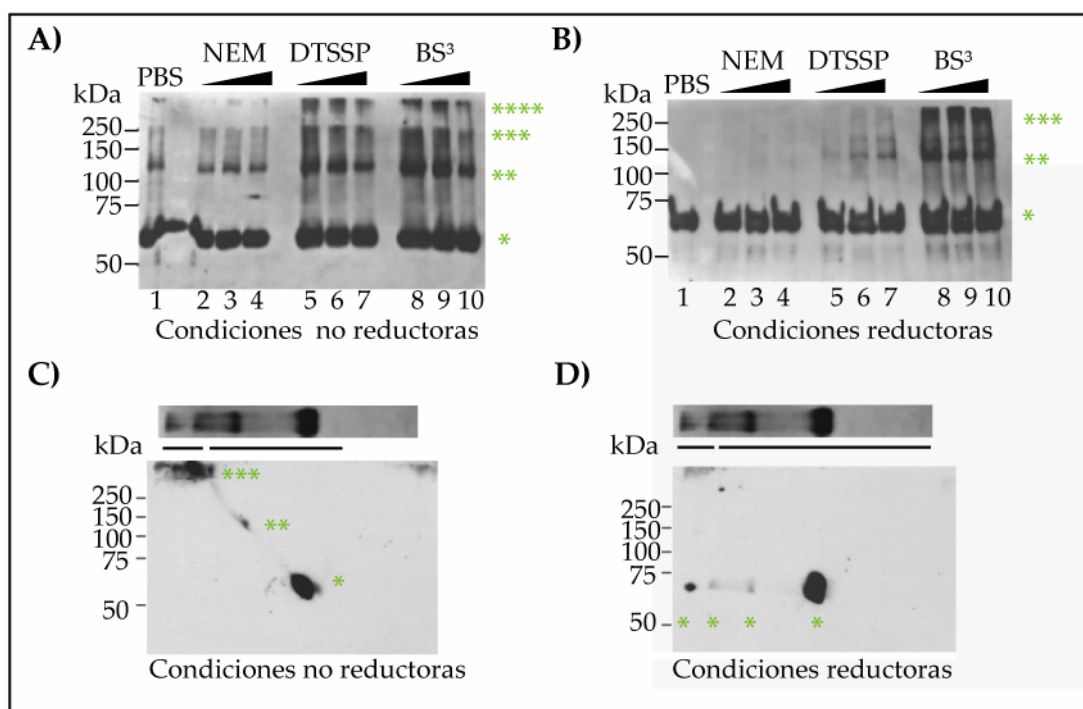


Figura 20. Análisis mediante *western-blot* de las formas oligoméricas de PToV-HE tras el tratamiento con concentraciones crecientes de NEM, BS³ y DTTSP en condiciones no reductoras (A) y reductoras (B). Análisis en dos dimensiones de los oligómeros de PToV-HE entrecruzados con 25 mM de DTTSP. La primera dimensión se llevó a cabo en condiciones no reductoras y la segunda dimensión en condiciones no reductoras (C) y reductoras (D).

Como se observa en la figura 20.A tanto en ausencia (carril 1) como en presencia de distintas concentraciones (5 mM, 10 mM y 20 mM) del agente de bloqueo NEM (carriles 2-4), se distinguen: la forma monomérica de la proteína HE (*), una banda de 120kDa (**) que correspondería con la forma dimérica de la proteína, proteínas de un peso molecular cercano a 250 kDa (***) que podrían corresponder a tetrameros de la proteína y otras que no han llegado a entrar en el gel (****). Sin embargo, como se muestra en la figura 20. B, tras la reducción de las proteínas con β -mercaptoetanol sólo se observa la banda correspondiente a la forma monomérica de la proteína tanto en la muestra sin tratar (carril 1) como en la muestras tratadas con NEM (carriles 2-4), lo que indica que la banda de 120kDa y las de mayor peso molecular son formas oligoméricas mediadas por puentes disulfuro.

3.4.1.1. Análisis de los oligómeros de HE mediante el tratamiento con agentes de entrecruzamiento químico

Otra aproximación al estudio de la formación de oligómeros por puentes disulfuro es la utilización de agentes de entrecruzamiento químico para unir de forma reversible o irreversible las diferentes subunidades del oligómero. Así, utilizamos para el estudio de las formas oligoméricas de PToV-HE, el reactivo BS³, para un entrecruzamiento irreversible y el reactivo DTTSP, para un entrecruzamiento reversible por agentes reductores. Ninguno de

estos dos reactivos puede atravesar la membrana plasmática por lo que sólo se entrecruzarán proteínas expuestas en la membrana celular. La longitud de estos agentes es de 11Å, por lo que el entrecruzamiento sólo se dará en proteínas que ya estén formando complejos de forma natural.

Para este análisis se infectaron monocapas de células BSC40 con rVV-HE y a las 24 hpi se trataron con diferentes concentraciones (5mM, 2,5mM o 1,25mM) de cada uno de los reactivos, según se describe en el apartado 8.5 de materiales y métodos. Tras el tratamiento con DTTSP (Figura 20.A, carriles 5-7) o BS³ (Figura 20.A, carriles 8-10) y en condiciones no reductoras se observan las mismas formas monoméricas y oligoméricas descritas en el caso de las muestras sin tratar o tratadas con NEM (Figura 20.A, carriles 1 y 2-4, respectivamente). Sin embargo, en presencia de β-mercaptoetanol (Figura 20.B), en los extractos de células no tratadas con los agentes de entrecruzamiento (carriles 1-4) y en las muestras tratadas con el agente reversible DTTSP (carriles 5-7) se observa la reducción de los puentes disulfuro tanto de la forma monomérica, que presenta una menor movilidad electroforética en estas condiciones, como de las formas oligoméricas. No obstante, en presencia de DTTSP también se detectan las formas dimericas (**) (carriles 5-7) aunque estas bandas son menos intensas que en condiciones no reductoras y su intensidad varía en función de la concentración de DTTSP, por lo que asumimos que su presencia se debe a reducciones parciales del agente de entrecruzamiento. En las muestras tratadas con el agente de entrecruzamiento irreversible BS³, se observa la reducción de los puentes disulfuro intramoleculares de la proteína en condiciones reductoras como revela el cambio en la movilidad electroforética de los monómeros de proteína. Sin embargo, el agente mantiene unidas las subunidades de los dímeros y los oligómeros, observándose las mismas bandas de alto peso molecular que las observadas en condiciones no reductoras (Figuras 20.A y B, carriles 8-10).

Para comprobar que, efectivamente, las bandas de mayor peso molecular están constituidas por oligómeros de la proteína HE, utilizamos una estrategia de electroforesis en dos dimensiones. La muestra de células tratadas con DTTSP 5mM se sometió a SDS-PAGE en condiciones no reductoras. Una vez separadas las proteínas, cortamos el carril entero del gel y lo incubamos durante 10 minutos en tampón de carga de proteínas en presencia o en ausencia de β-mercaptoetanol. A continuación, colocamos el fragmento de poliacrilamida correspondiente al carril completo de forma horizontal en la parte superior de un nuevo gel de poliacrilamida y sometimos a las proteínas a una nueva electroforesis. La proteína se detectó mediante *western-blot* utilizando el suero anti-HEpept.

Como se observa en la figura 20.C, cuando la segunda dimensión se lleva a cabo en condiciones no reductoras las formas diméricas vuelven a separarse a la altura de 120 kDa (**) y las formas multiméricas quedan retenidas en el gel concentrador (***). Sin embargo, los puentes disulfuro tanto de las estructuras oligoméricas como de las diméricas son reducidos tras el tratamiento con β -mercaptoetanol y éstas migran entonces como monómeros de proteína HE (*) (Figura 20.D).

Estos resultados demuestran que la proteína HE expresada mediante un recombinante del virus vaccinia forma estructuras diméricas y otras estructuras multiméricas mediadas por puentes disulfuro. Además, estas estructuras están presentes en la membrana celular, lo que indica que son formas maduras de la proteína.

3.4.2. DISTRIBUCIÓN SUBCELULAR DE LA PROTEÍNA HE

Una vez caracterizada la proteína por *western-blot*, analizamos el patrón de distribución subcelular mediante microscopía confocal. Para este ensayo células HeLa crecidas sobre un cubreobjetos se infectaron con el virus rVV-HE a alta multiplicidad (5ufp/célula). Como control negativo utilizamos un virus vaccinia recombinante no relacionado rVV-Luc. A las 8 hpi, las células se fijaron con paraformaldehído al 4% y se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0,1% o no se trataron con ningún detergente. Para detectar la proteína HE se utilizó el suero anti-HEpept y un anticuerpo secundario acoplado al fluorocromo Alexa-488.

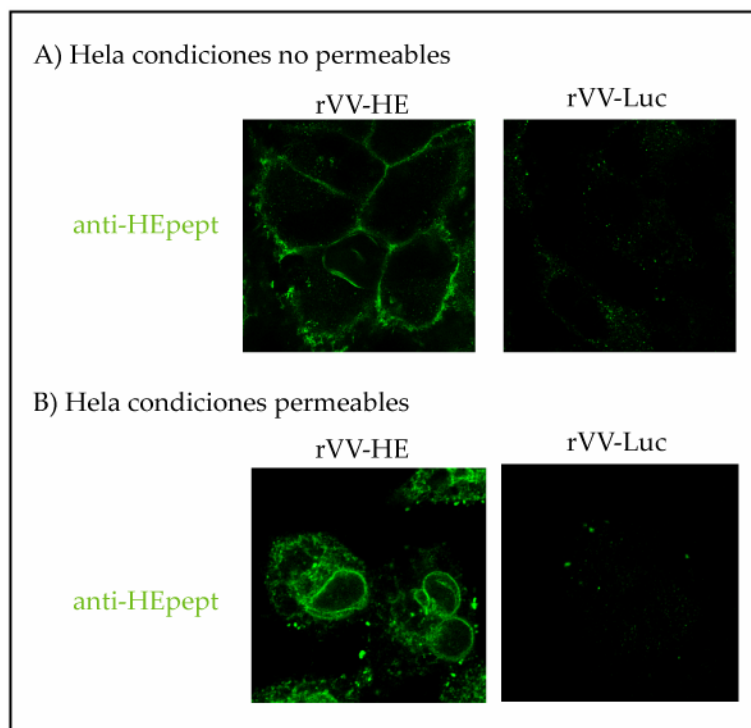


Figura 21. Análisis por microscopía confocal de la expresión de la proteína HE. Se infectaron células HeLa crecidas en cubreobjetos con el virus rVV-HE (5 ufp/célula) o el virus control rVV-Luc. A las 8 hpi, las células se fijaron con PFA 4% y se permeabilizaron o no con Tritón X-100 al 0,1%, y se incubaron con el anticuerpo anti-HEpept. La proteína se detectó con un anticuerpo anti-IgG de conejo acoplado al fluorocromo Alexa 488 y se visualizó en un microscopio confocal. En la figura se muestra un corte longitudinal de las células.

En la figura 21.A, se observa cómo en las células infectadas con el rVV-HE no permeabilizadas, la proteína HE se localiza en la superficie de la membrana celular. Por el contrario, en las células permeabilizadas (Figura 21.B) se observa marcaje en la membrana nuclear así como un marcaje citoplasmático reticular concentrado principalmente en una región cercana al núcleo. Las células infectadas con el virus vaccinia no relacionado rVV-Luc no mostraron reactividad específica con el suero anti-HEpept.

Estos datos correlacionan con los resultados descritos anteriormente (Cornelissen y col., 1997) para la proteína HE de BRV, según los cuales, la proteína HE de torovirus es una proteína de membrana.

3.4.3. FUNCIONALIDAD DE LA PROTEÍNA HE

Como ya se ha comentado anteriormente, la proteína HE de torovirus se ha descrito como una enzima destructora de receptores (RDE) con un dominio catalítico con actividad acetilesterasa y un dominio de unión a ácidos siálicos. Por ello, a continuación, quisimos determinar si la proteína HE de PToV expresada mediante el recombinante de vaccinia mantiene su funcionalidad.

3.4.3.1. Ensayo de actividad acetilesterasa

En primer lugar, quisimos evaluar la actividad acetilesterasa de la proteína en las células infectadas por rVV-HE utilizando para ello el sustrato sintético α -naftilacetato como ya hicimos con la proteína HE expresada mediante el sistema de baculovirus (Figura 14).

En este caso, se infectaron monocapas de células BSC40 sembradas en placas de 6 pocillos con 100ufp de los virus rVV-HE o WR y se incubaron durante 3 días en medio DMEM con 1% agar. Cuando se observó la aparición de placas de lisis se retiró el agar, se fijaron las células con la solución de fijación CAF (ver materiales y métodos) y se añadió el reactivo α -naftilacetato. Tras media hora a 37°C, se lavaron las monocapas con PBS. Se observó la aparición de precipitados coloreados de α -naftol en las células infectadas por el rVV-HE que rodean a la placas de lisis, mientras que en las células infectadas con el WR no se observó actividad esterasa. Para visualizar con mayor claridad las placas de lisis se tiñeron las monocapas con cristal violeta (Figura 22).

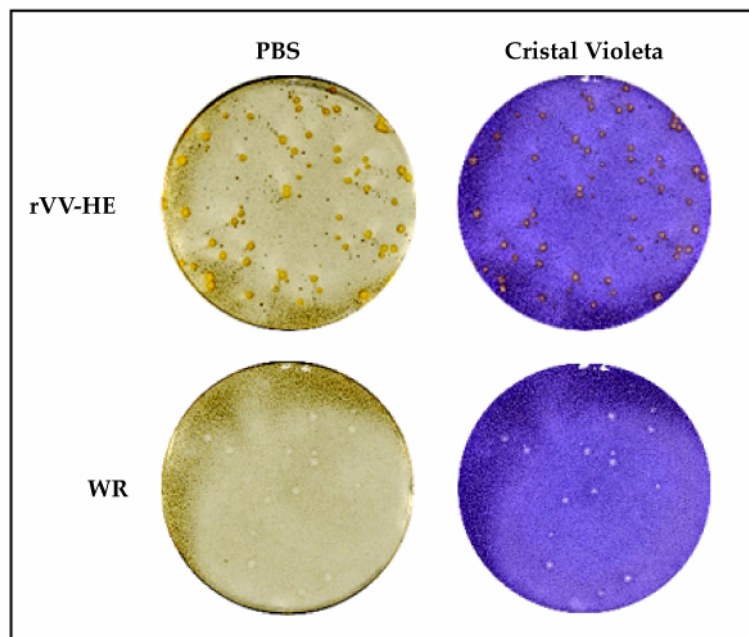


Figura 22. Ensayos de la actividad acetilesterasa de PToV-HE. Ensayo ANAE: monocapas de células BSC40 infectadas con 100 ufp del virus rVV-HE o WR y cultivadas en medio sólido 72 h, se incubaron con una solución de α -naftil acetato 30 min a 37°. Tras retirar el medio de reacción se lavaron las monocapas con PBS, se visualizaron los precipitados (izquierda) y se tiñeron las monocapas con cristal violeta (derecha).

Con estos resultados se demuestra que la proteína HE de PToV expresada en células de mamífero a partir del virus rVV-HE conserva su actividad esterasa frente al sustrato sintético α -naftil acetato.

3.4.3.2. Ensayo de unión a ácidos siálicos

A continuación, quisimos analizar la capacidad de unión de la proteína HE a los ácidos siálicos. Está descrito que las partículas virales de BEV y BToV tienen capacidad hemoaglutinante (Weiss y Horzinek, 1986, Koopmans y col., 1986) . El virus BEV aglutina eritrocitos de conejo y humanos del grupo O, mientras que el virus BToV aglutina eritrocitos de rata y de ratón. Dado este diferente comportamiento entre los distintos torovirus, analizamos la actividad hemaglutinante de la proteína HE de PToV, mediante un ensayo de hemoadsorción con eritrocitos de conejo, rata, ratón y humanos del grupo O. Para llevar a cabo el ensayo utilizamos células BSC40 infectadas con el recombinantes rVV-HE, el virus rVV-Luc como control negativo o el virus WR ya que a diferencia de los virus recombinantes derivados de el, este mantiene intacta su propia hemoaglutinina (HA), por lo que nos servirá como control positivo de hemoadsorción. A las 24 hpi, se retiró el medio de cultivo y se incubaron las células con soluciones al 2% de eritrocitos de conejo, rata, ratón o humano durante 30 minutos a 37°C que es la temperatura óptima de la actividad enzimática, o a 4°C para inhibirla. Tras la incubación, las células se lavaron repetidas veces con PBS a 37°C o a 4°C para eliminar los eritrocitos no adsorbidos y se fijaron con paraformaldehído al 4%.

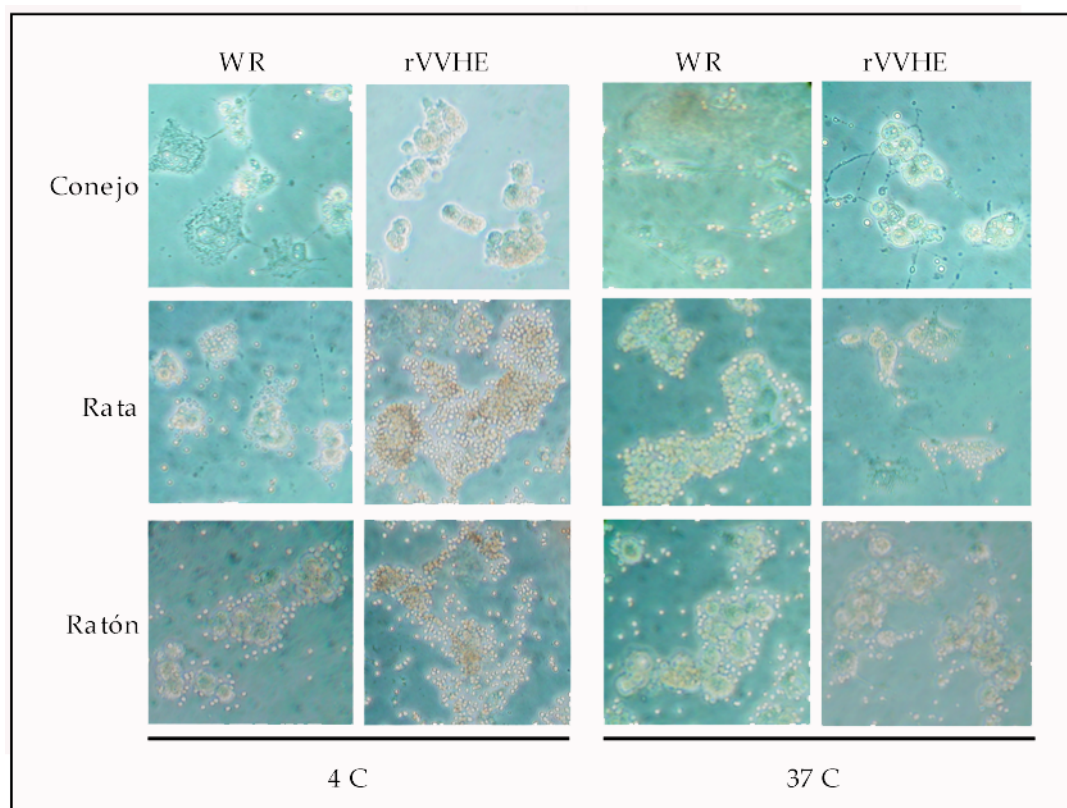


Figura 23. Ensayo de hemoadsorción. Se infectaron células BSC40 con el virus rVV-HE o el virus WR. A las 24 hpi, las monocapas de células se incubaron 30 minutos con una suspensión al 1% de eritrocitos RBCs de conejo, de rata y de ratón a 4 °C o a 37 °C según se indica en la parte inferior de la figura. A continuación se lavaron las células con PBS a 4°C o a 37 °C y se fijaron con paraformaldehído al 4% y se visualizó el resultado al microscopio óptico.

En la figura 23 se observa cómo a 4°C la proteína HE expresada en las células infectadas con el rVV-HE aglutina los eritrocitos de rata y de ratón, pero no los eritrocitos de conejo o los humanos (no mostrado). A 37°C, sin embargo, no se observa aglutinación en ningún caso ni siquiera de los eritrocitos de rata y ratón. Por su parte, la proteína hemoaglutinina del virus WR a 4°C sólo aglutina los eritrocitos de ratón. En cambio a 37°C, la HA de WR aglutina tanto los eritrocitos de rata como de ratón y humano, pero no los de conejo. Las células infectadas con el rVV-Luc no causaron aglutinación en ningún caso (no mostrado).

Estos resultados demuestran que la proteína HE de PToV-BRES2 expresada a partir del virus recombinante rVV-HE, no sólo se localiza en la membrana celular sino que es funcional ya que posee tanto capacidad de unión a los ácidos siálicos presentes en la superficie de los eritrocitos, como actividad acetilesterasa capaz de degradarlos, impidiendo así la unión permanente de los eritrocitos a las células.

3.4.4. PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA HE

Una vez caracterizada la proteína HE recombinante expresada en células de mamífero, nos propusimos purificarla para utilizarla como antígeno en ensayos para la detección de anticuerpos frente a torovirus en muestras clínicas de suero. Por ello infectamos células BSC40 a alta multiplicidad con el virus rVV-HE y purificamos la proteína mediante inmunocaptura, según se ha descrito en el apartado 8.4.2 de materiales y métodos.

Como se observa en la figura 24, la proteína HE es capturada por los anticuerpos anti-HEpept y posteriormente eluida con los péptidos sintéticos. La proteína HE se purificó como una banda principal de 65kDa y una escalera de bandas de mayor peso molecular (Figura 24.A) que son también reconocidas por el suero anti-HE286E1 (Figura 24.B). En presencia de un agente reductor como β -mercaptoetanol, estas formas agregadas de la proteína desaparecen y se obtiene una única banda de 65 kDa (datos no mostrados).

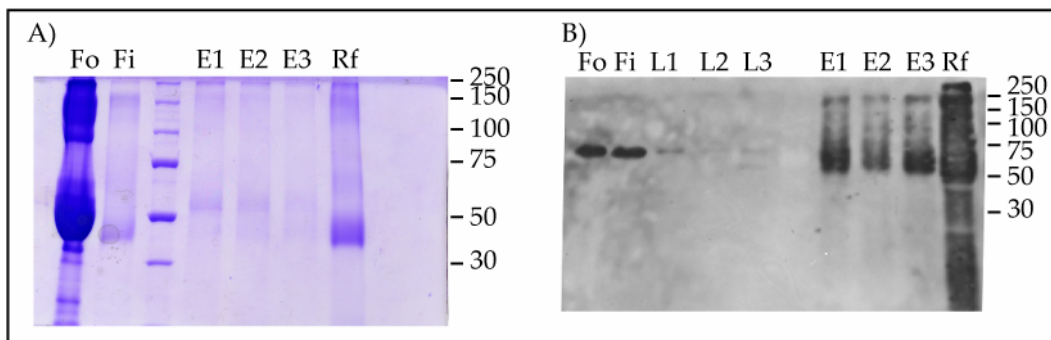


Figura 24. Purificación de la proteína HE expresada en células de mamífero. La presencia de la proteína se analizó en los distintos pasos de purificación mediante SDS-PAGE y tinción del gel con azul coomassie (A) y *western-blot* con el suero anti-HE286E1 (B). (Fo) extracto de células infectadas con rVV-HE, (Fi) proteína HE capturada por los anticuerpos, (L1, L2, L3) lavados con la solución de lisis, (E1, E2, E3) eluciones de la proteína HE y (Rf) proteína HE que permanece unida a la sefarosa después de la elución.

Las muestras de proteína se dializaron frente a la solución de lisis sin Tritón X-100 y la proteína obtenida se cuantificó mediante un ensayo de BCA. Se obtuvieron 1,5 μ g de proteína por $2 \cdot 10^7$ células. Esta proteína purificada ha sido utilizada en ensayos de ELISA para la detección de anticuerpos frente a PToV, como se detallará en el siguiente apartado.

4. DESARROLLO DE UN MÉTODO DE ELISA PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS FRENTE A TOROVIRUS PORCINO EN MUESTRAS DE SUERO

Nuestro siguiente objetivo fue desarrollar un sistema de diagnóstico serológico frente a PToV, utilizando las proteínas recombinantes N y HE de PToV purificadas tal y como se ha descrito en apartados anteriores.

4.1. OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE ELISA

4.1.1. SELECCIÓN DEL ANTÍGENO ÓPTIMO PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS

En este trabajo hemos descrito la purificación de las proteínas M, HE y N de PToV. Para el desarrollo de un ELISA de diagnóstico, en primer lugar quisimos analizar cuales de estos antígenos eran los más indicados para la detección de anticuerpos frente a PToV. Se ha descrito que la proteína N es la más abundante e inmunogénica de las proteínas de torovirus (Horzinek y col., 1985). Además está muy conservada entre los torovirus, por lo que sería un buen candidato para nuestro propósito. Igualmente, la proteína HE podría ser un buen antígeno ya que está expuesta en la superficie de la partícula viral y es antigénica como demuestra el hecho de que los sueros de cerdo anti-BRES y Serotec la reconozcan. En cuanto a la proteína M, esta es muy poco inmunogénica como demuestran resultados obtenidos en el laboratorio con sueros hiperinmunes frente a BEV que no reconocen sin embargo la proteína M del virus, por lo que descartamos la proteína M de PToV para nuestro objetivo. Con estas consideraciones, decidimos comparar la reactividad de los sueros porcinos frente a las proteína N y HE. Para ello analizamos la reactividad de diluciones seriadas de los sueros de cerdo Serotec y anti-BRES frente a 400ng por pocillo de proteína N o de proteína HE, diluidas ambas en tampón carbonato (pH 9,6). Como control positivo utilizamos los sueros anti-HEpept y anti-PToV-N específicos para las proteínas N y HE. El ensayo de ELISA se llevó a cabo siguiendo el procedimiento descrito en materiales y métodos.

Como se observa en la figura 25, la reactividad frente a la proteína HE en los sueros de cerdo fue inferior a la obtenida frente a la proteína N. Sin embargo, el suero control anti-HEpept reaccionó intensamente con la proteína HE, indicando que la menor reactividad de los sueros de cerdo no se debe a una menor adsorción de este antígeno a los pocillos, sino a una menor antigenicidad de la proteína HE respecto a la proteína N. Con este resultado y teniendo en cuenta que la proteína N se purifica fácilmente y en gran cantidad mediante el sistema de baculovirus decidimos prescindir por el momento de la proteína HE y utilizar la proteína N como antígeno en los ensayos de ELISA.

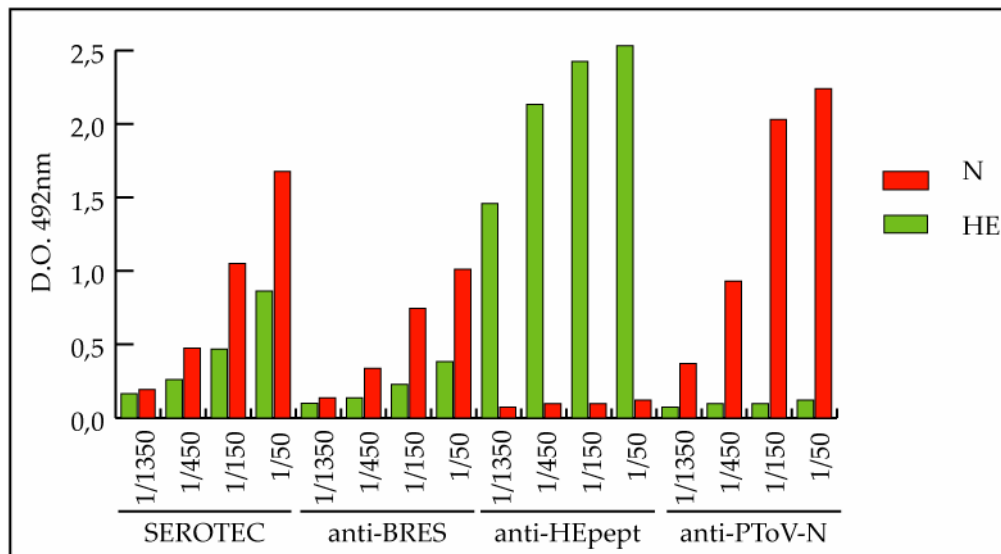


Figura 25. Análisis mediante ELISA de la reactividad de los sueros de cerdo anti-BRES y Serotec en diluciones seriadas 1:3 frente a 400 ng por pocillo de las proteínas N o HE de PToV-BRES2. Los sueros anti-PToV-N y anti-HEpept sirvieron como control.

4.1.2. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE TAPIZADO

Dado que las preparaciones de proteína N se mantienen en presencia de urea, analizamos el posible efecto que pudiera tener la urea en el ensayo de ELISA. Para ello, se utilizaron dos preparaciones de proteína N, una dializada frente a PBS y otra en la que la proteína N se había mantenido en la solución de urea 8M. La proteína N de cada una de estas preparaciones se diluyó a una concentración de 1 ng/μl en tampón carbonato en ausencia o en presencia de distintas concentraciones de urea (4, 5, 6 y 8 M). Estas preparaciones se utilizaron para tapizar los pocillos de una placa de ELISA (50 μl de solución de proteína por pocillo) y se analizaron frente a diluciones seriadas 1:2 del suero comercial de cerdo Serotec.

Como se observa en la figura 26.A, la preparación de proteína N dializada y en ausencia de urea (0 M) mostró una reactividad mucho menor que la obtenida con la proteína N mantenida en urea (Figura 26.B) en las mismas condiciones de tapizado. Sin embargo, la reactividad del suero frente a ambas preparaciones de proteína se igualó conforme se utilizó urea en las soluciones de tapizado, lo que sugiere que la urea no solo no altera la capacidad de adsorción del antígeno al pocillo ni la posterior reacción inmunoenzimática, sino que mejora la reactividad de los anticuerpos frente a la proteína, probablemente debido a que al mantenerla desnaturalizada los determinantes antigénicos están más accesibles a los anticuerpos. Con estos resultados decidimos mantener la proteína solubilizada en urea 8M después de la purificación.

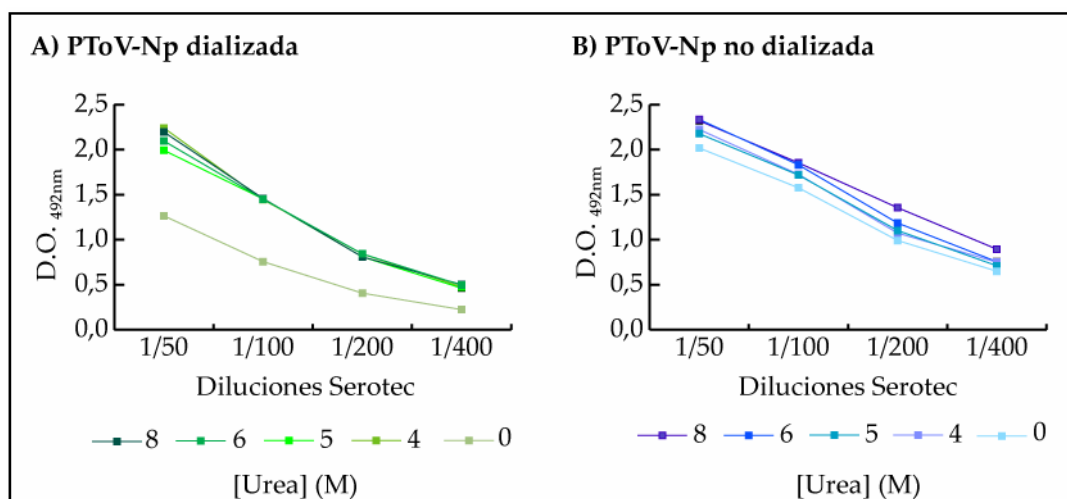


Figura 26. Análisis por ELISA de la reactividad del suero de cerdo Serotec frente a PToV-N en presencia o en ausencia de urea. La proteína N purificada, dializada y resuspendida en PBS (A) o purificada y mantenida en urea 8M después de la purificación (B), se utilizó para tapizar pocillos de una placa de ELISA utilizando como solución de tapizado tampón carbonato con distintas concentraciones de urea (0, 4, 5, 6, 8 M) y se hizo reaccionar con diluciones seriadas 1:2 del suero control Serotec.

4.1.3. OPTIMIZACIÓN DE LA CANTIDAD DE ANTÍGENO Y DILUCIÓN DE LOS SUEROS

Una vez establecido el antígeno a utilizar, evaluamos la cantidad de éste que nos ofrecía mayor sensibilidad. Para ello, analizamos la reactividad de diluciones seriadas 1:2 del suero anti-PToV-N frente a diferentes cantidades de la proteína N.

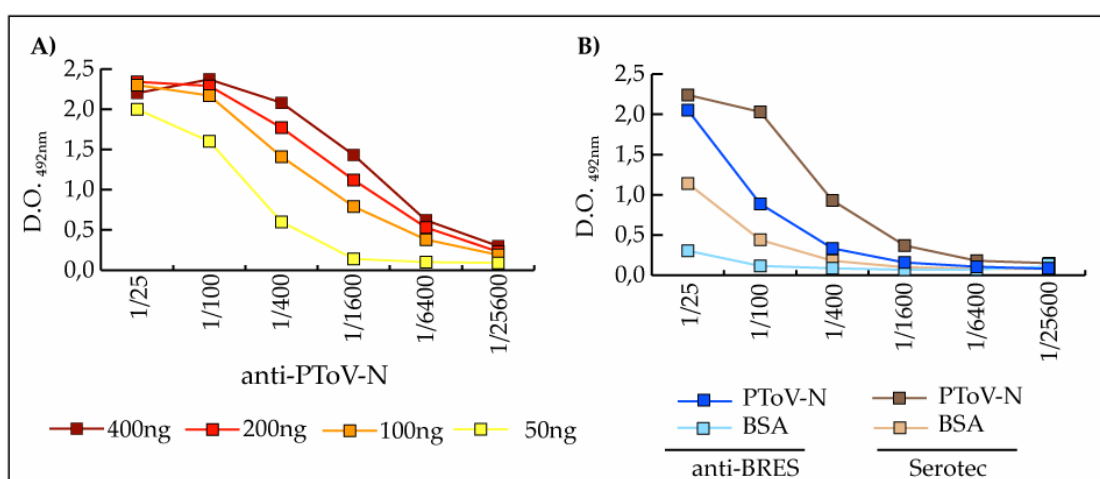


Figura 27. Optimización de las condiciones del ELISA frente a la proteína N. A) Reactividad de diluciones del suero anti-PToV-N frente a distintas cantidades (400, 200, 100 y 50 ng) de proteína N. B) Reactividad de diluciones de los sueros de cerdo Serotec y anti-BRES frente a 400ng de proteína N o de BSA.

Como se observa en la figura 27.A, en las diluciones intermedias de suero hiperinmune anti-PToV-N (1/400-1/1600) la mayor sensibilidad se obtuvo con 400 ng de proteína N por

pocillo. Con el suero porcino Serotec se obtuvo un resultado similar (datos no mostrados). Por lo tanto, consideramos esta cantidad de antígeno como la óptima para la detección de anticuerpos.

A continuación determinamos, en estas mismas condiciones, la dilución de los sueros de cerdo que nos aportaban mejor relación entre la señal específica y el fondo. Este análisis se llevó a cabo utilizando diluciones seriadas de los sueros de cerdo anti-BRES y Serotec y 400ng de PToV-N o BSA como antígeno control. Como se observa en la figura 27.B, la dilución óptima para los sueros de cerdo fue 1:100, ya que a esta dilución se pueden distinguir mejor las diferencias de reactividad entre los distintos sueros que a una dilución 1:25 y además, se obtiene una mayor sensibilidad que a una dilución 1:400, a la que la reactividad del suero anti-BRES frente a la proteína N es equivalente a la obtenida frente a la BSA. Además, el resultado demuestra que el suero comercial de cerdo Serotec posee un mayor título de anticuerpos frente a la proteína N que el suero de cerdo anti-BRES.

4.1.4. ANÁLISIS DE REACTIVIDAD CRUZADA ENTRE DISTINTOS VIRUS PORCINOS

Una vez establecidas las condiciones del ELISA frente a la proteína N, evaluamos posibles reacciones de reactividad cruzada con otros virus porcinos relacionados. Escogimos dos virus del orden Nidovirales, el virus del síndrome respiratorio reproductivo de cerdo (PRRSV) y el virus de la gastroenteritis porcina transmisible (TGEV), que pertenecen a las familias *Arteriviridae* y *Coronaviridae*, respectivamente.

Analizamos la reactividad de los sueros de cerdo anti-BRES y Serotec, del suero específico para BEV (anti-BEV) y de los sueros de cerdo específicos para PRRSV (anti-PRRSV) y PRCV (anti-PRCV) (El coronavirus respiratorio de cerdo (PRCV) es un mutante de delección de TGEV, y solo se distinguen por métodos sexológicos utilizando anticuerpos monoclonales (Zhang y col., 2007)), descritos en el apartado 4 de materiales y métodos. Como control negativo se utilizó suero de un animal libre de patógenos (spf) no inmunizado. La reactividad de estos seis sueros se analizó en paralelo frente a 250 ng/pocillo de los virus BEV, PRRSV y TGEV purificados y 400 ng/pocillo de proteína N purificada. Los pocillos se incubaron por duplicado con una dilución 1:100 de cada uno de los sueros porcinos y el suero anti-BEV.

Como se observa en la figura 28.A, los sueros de cerdo anti-PRCV y anti-PRRSV no reconocieron las proteínas de BEV ni la proteína N de PToV. Por otra, parte el suero anti-BEV reaccionó principalmente frente al virus BEV purificado y la proteína N de PToV. Sin embargo, no reconoció las proteínas de TGEV o PRRSV. Por su parte, los sueros de cerdo anti-

BRES y Serotec reaccionaron frente a PRRSV, TGEV y BEV, si bien la reactividad frente a la proteína N de PToV fue siempre superior. Por su parte el suero del animal spf no reaccionó con ninguno de los virus, ni con la proteína N de PToV.

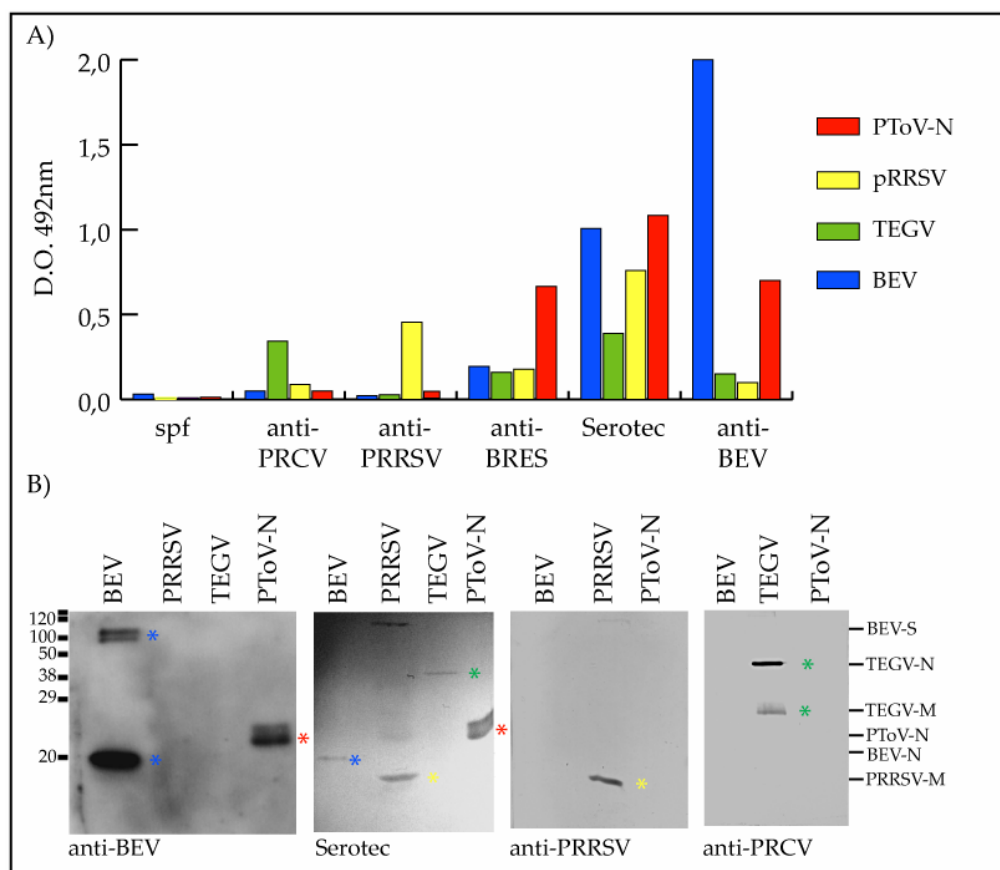


Figura 28. Análisis de reactividad cruzada entre los anticuerpos frente a los virus de cerdo TGEV y PRRSV y la proteína N de PToV y el virus BEV. A) análisis mediante ELISA de la reactividad de los sueros específicos anti-PRCV, anti-PRRSV y anti-BEV, de los sueros de cerdo positivos para PToV anti-BRES y Serotec, y del suero control spf frente a proteína N de PToV purificada y frente a preparaciones de virus purificado de PRRSV, TGEV y BEV. B) Reactividad por *western-blot* de los sueros anti-PRCV, anti-PRRSV, anti-BEV y Serotec frente a la proteína N purificada y frente a preparaciones de virus purificado de PRRSV, TGEV y BEV. Los asteriscos señalan las posiciones de las proteínas de BEV (*), PRRSV (*), TGEV (*) y PToV-N (*).

Para comprobar la especificidad de la reactividad del suero Serotec frente a los otros virus de cerdo, se separaron por SDS-PAGE 2 µg de BEV, 10 µg de TGEV o PRRSV y 6 µg de la proteína PToV-N y se analizó la reactividad por *western-blot* con una dilución 1:100 de los sueros anti-BEV, Serotec, anti-PRCV y anti-PRRSV.

Como se observa en la figura 28.B, el suero de cerdo Serotec además de reconocer las proteínas N de PToV y de BEV, también reaccionó frente a proteínas de PRRSV y de TGEV que, por sus respectivos pesos moleculares, corresponderían con las proteínas N de ambos virus. Sin embargo, el suero anti-BEV, reaccionó únicamente con las proteínas S y N de BEV y

la proteína N de PToV y no frente a las proteínas de TGEV ni de PRRSV. Igualmente los sueros de cerdo anti-PRRSV y anti-PRCV reconocieron las proteínas de PRRSV y TGEV, respectivamente, pero no se observó reactividad con las proteínas de los torovirus. La reactividad del suero comercial Serotec frente a proteínas de estos tres virus indica que los animales de los que procede este suero han sido infectados con estos virus o en el caso de PRRSV y TGEV vacunados, en algún momento de su vida.

Estos resultados demuestran que no existe reactividad cruzada entre PRRSV, TGEV y PToV, aunque sí entre los torovirus de las distintas especies tal y como se había descrito anteriormente (Beards y col., 1986). Por lo tanto, la utilización de la proteína N de PToV en ELISA permite detectar de forma específica la presencia de anticuerpos frente a torovirus.

4.2. ANÁLISIS DE SUEROS DE CERDO PROCEDENTES DE GRANJAS ESPAÑOLAS

En este punto, quisimos evaluar el ensayo de ELISA frente a la proteína N como método para la detección de anticuerpos frente a PToV en muestras de campo de sueros porcinos. Para evaluar un nuevo método de diagnóstico serológico, generalmente se utilizan sueros de referencia positivos y negativos para el patógeno a estudiar. Esto permite comparar los resultados obtenidos con el nuevo método y los obtenidos con el método de referencia y de esta forma, se establecen los parámetros de especificidad y sensibilidad del ensayo. Sin embargo, para PToV no existen sueros de referencia positivos ni negativos, por lo que decidimos analizar sueros de cerdo de distintas granjas de diferentes regiones de España mediante nuestro sistema de ELISA y comparar los resultados con aquellos obtenidos mediante otros métodos serológicos, previamente utilizados en el estudio de los torovirus, como el *western-blot* o el ensayo de neutralización de la infectividad viral de BEV (Liebermann, 1990). De esta forma, si encontrásemos sueros positivos y negativos podríamos generar nuestros propios sueros de referencia.

Con este objetivo solicitamos a las granjas de ganado porcino que nos habían remitido previamente muestras de heces, que nos enviaran sueros de cerdo. Se recogieron 10 sueros de cerdas procedentes de una granja de Navarra, 20 muestras de suero de cerdas adultas de la granja de Aragón donde habíamos detectado la muestra positiva de PToV (PToV-ZAR2) por RT-PCR (ver apartado 1.4 de resultados) y 15 sueros de lechones de 6 a 8 semanas remitidos desde el Centro de Investigación en Sanidad Animal (CISA) en Madrid, procedentes de granjas de Galicia consideradas como de alto nivel higiénico.

4.2.1. ANÁLISIS MEDIANTE ELISA

El análisis mediante ELISA de los sueros de cerdo se llevó a cabo siguiendo las condiciones anteriormente establecidas, es decir, 400ng por pocillo de proteína N como antígeno específico o igual cantidad de BSA como control negativo. Los sueros de cerdo se analizaron a una dilución 1:100 y en cada placa de ELISA se analizó, en paralelo con los sueros problema, el suero Serotec como control positivo y una mezcla de cuatro sueros de cerdos spf como control negativo.

En todas las placas de ensayo, los sueros spf mostraron valores de densidad óptica de entre 0,1 y 0,2 frente a PToV-N y BSA, mientras que como ya habíamos observado anteriormente, el suero control Serotec reaccionó con la proteína N y también se observó cierta reactividad frente a BSA.

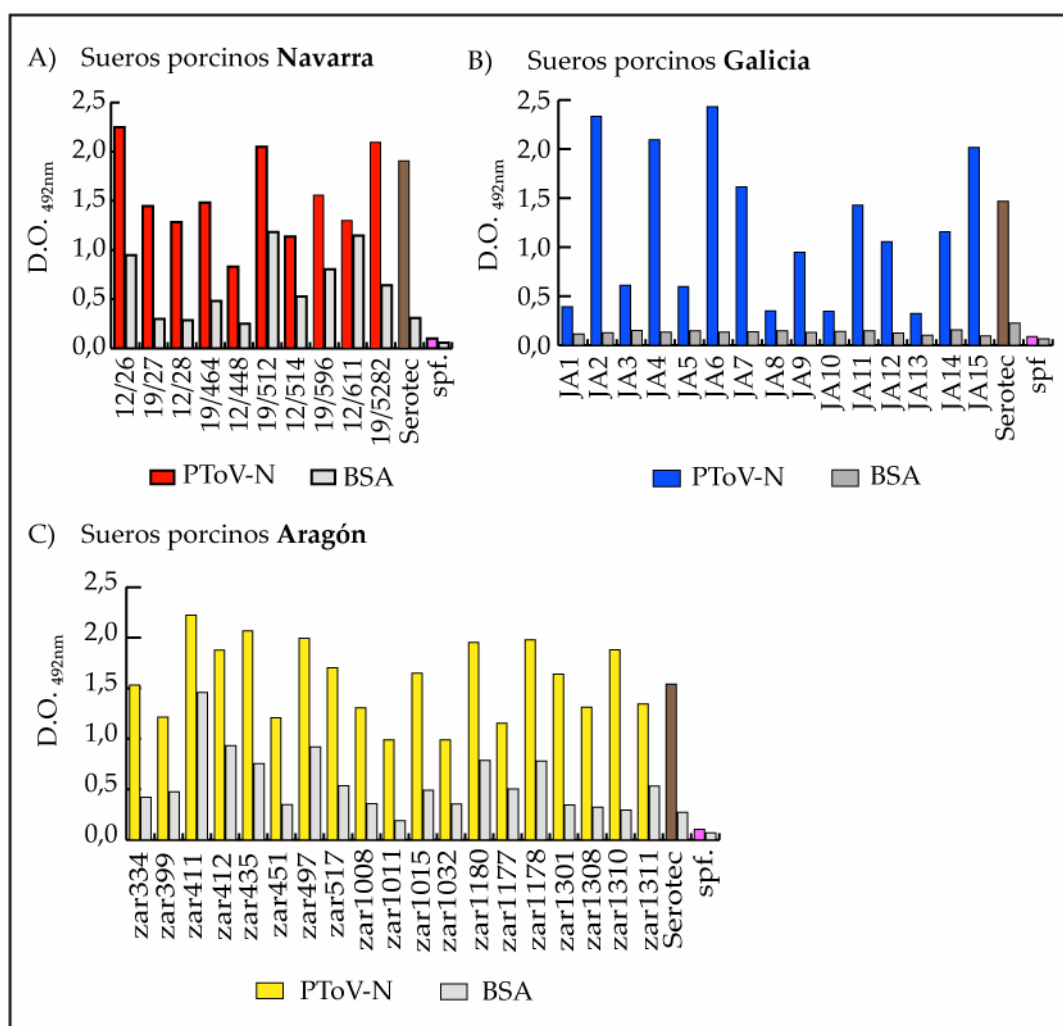


Figura 29. Análisis de los sueros de cerdos procedentes de Navarra (A), Aragón (B) y Galicia (C), mediante ELISA frente a 400 ng de proteína N de PToV y frente a 400 ng de BSA. Tanto los sueros de campo como los sueros utilizados como control positivo (Serotec) y negativo (spf) se utilizaron a una dilución 1:100.

Como se observa en la figura 29, de los 45 sueros analizados, 41 (91%) reaccionaron frente a la proteína N con valores de densidad óptica igual o superior a 0,5 y solo 4 (8%) dieron valores inferiores a 0,5. Sin embargo, también se observó reactividad frente a la BSA en los sueros procedentes de Navarra (Figura 29.A) y en los procedentes de Aragón (Figura 29.C), no así en los de Galicia (Figura 29.B). En ningún caso, la reactividad frente a la BSA fue superior a la obtenida frente a la proteína N, aunque en el caso del suero de Navarra 12/611 ambas fueron equivalentes y superiores a 1.

4.2.2. ANÁLISIS MEDIANTE WESTERN-BLOT

Como se ha comentado anteriormente, a falta de sueros de referencia, la validación de nuestro método de ELISA pasa por comparar los resultados con otras técnicas de diagnóstico utilizadas previamente para torovirus. En primer lugar, analizamos mediante *western-blot* los sueros de cerdo de granjas españolas. Este método es menos sensible que el ELISA pero permite comprobar que el suero reconoce específicamente el antígeno en cuestión, en este caso la proteína N de PToV. El análisis se llevó a cabo utilizando la misma cantidad de proteína N purificada (400ng) y la misma dilución del suero (1:100) que en los ensayos de ELISA. Nuevamente los sueros de cerdo Serotec y spf sirvieron como controles positivo y negativo, respectivamente.

Como se observa en la figura 30.A, los sueros porcinos reconocieron específicamente la proteína N en *western-blot*. Sin embargo, hay que señalar que el revelado se tuvo que realizar utilizando 4-cloronaftol en lugar del reactivo ECL que proporciona mayor sensibilidad, debido a que con este último aparecía un fondo inespecífico en toda la membrana de nitrocelulosa que impedía visualizar el resultado sin ayuda de un transiluminador. Puesto que en los ensayos por ELISA se había observado reactividad frente a la BSA creemos que este fondo inespecífico podría atribuirse a algún componente de los sueros que está reaccionando con la BSA utilizada en el bloqueo de las membranas. Nuevamente esta reactividad inespecífica se observó en los sueros de Aragón y Navarra pero no en los sueros de Galicia, lo que sugiere que es debida a alguna característica de los sueros. Nuestro objetivo al utilizar BSA, era disponer de un antígeno irrelevante como medida de una señal inespecífica de los sueros. Sin embargo, nuestros resultados muestran una alta reactividad frente a la BSA en algunos sueros, por lo que decidimos no incluir este control en los siguientes ensayos de ELISA. La reactividad de algunos sueros de animales frente a la BSA se ha descrito anteriormente en la bibliografía (Escribano y col., 1989).

Como se observa en la figura 30, todos los sueros de Aragón dieron positivo por *western-blot*. De los sueros procedentes de Galicia, 6 resultaron negativos por *western-blot* (JA1, JA3, J5, JA8, JA10 y JA13). En el caso de los sueros de Navarra, todos los sueros fueron positivos, incluido el suero 12/611 que por ELISA había mostrado una reactividad equivalente frente a la proteína N y la BSA.

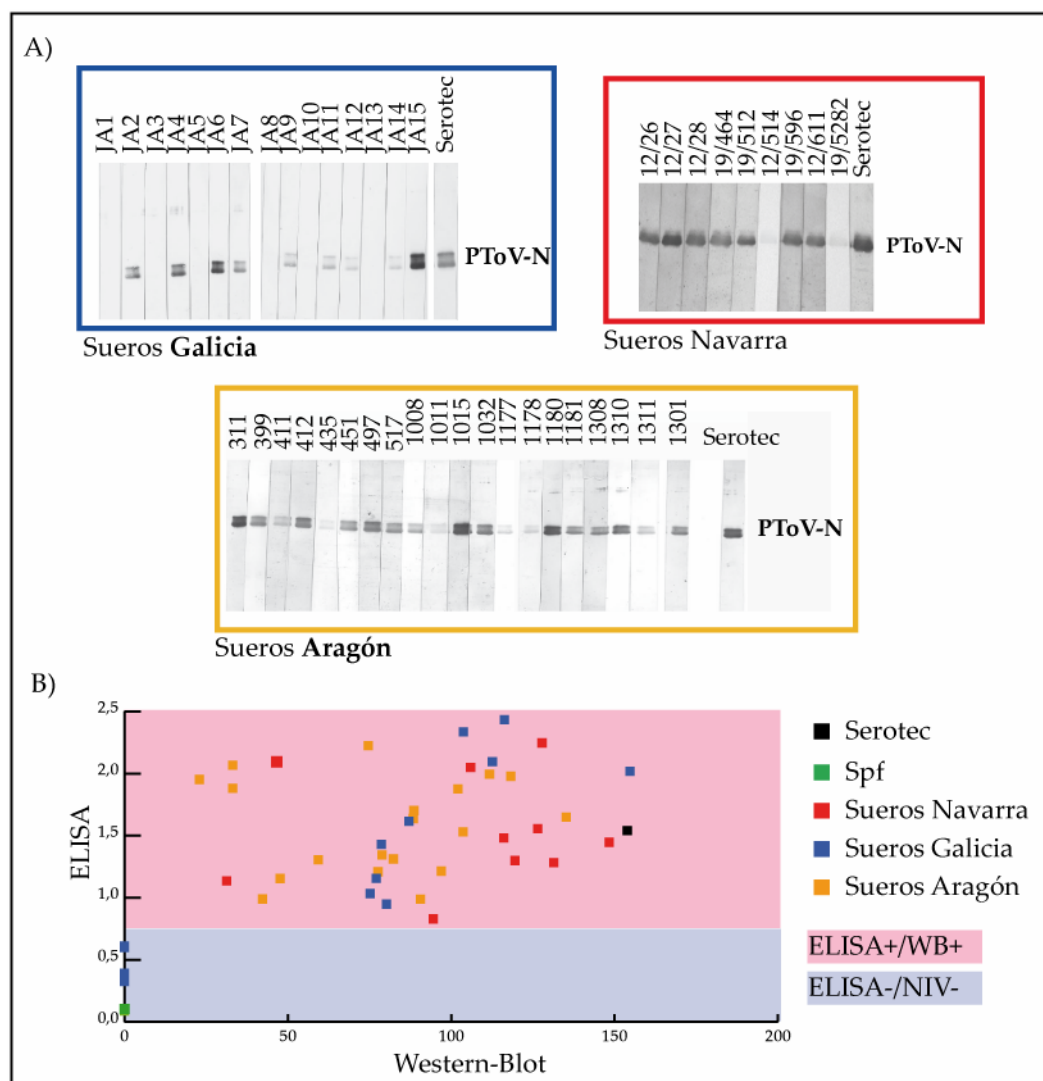


Figura 30. A) Análisis por *western-blot* de los sueros de Galicia, Navarra y Aragón frente a 400 ng de proteína N de PToV purificada. **B) Distribución de los valores** obtenidos por ELISA y por *western-blot* para cada suero analizado. En el eje de ordenadas se representan los valores de D.O._{492nm} obtenidos por ELISA y en el eje de abscisas la intensidad de las bandas obtenidas por *western-blot* determinada por densitometría. El color de los puntos indica la procedencia del suero. El valor de Serotec se indica con un punto negro y el del suero spf con un punto verde.

Para establecer un primer punto de corte entre los resultados positivos y negativos para los ensayos de ELISA, cuantificamos la señal obtenida frente a PToV-N por *western-blot* mediante densitometría de las bandas para compararla con los valores obtenidos por ELISA. En la figura 30.B, se muestra la distribución de los valores obtenidos para cada suero mediante

ambas técnicas. A partir de esta gráfica determinamos como punto de corte una densidad óptica por ELISA de 0,7. Por encima de 0,7, todos los sueros fueron positivos por *western-blot* por lo que la reactividad frente a la proteína N se puede confirmar mediante *western-blot*. Todos los sueros, con un valor de ELISA inferior a 0,7 fueron negativos por *western-blot*, por lo que o el suero es negativo o la sensibilidad del *western-blot* no permite confirmar el resultado de ELISA y será necesario utilizar otra técnica.

4.2.3. ANÁLISIS MEDIANTE NEUTRALIZACIÓN DE BEV

Para corroborar los resultados obtenidos por ELISA y *western-blot* quisimos analizar los sueros utilizando un ensayo de neutralización de la infectividad viral. Esta técnica permite cuantificar el título de anticuerpos neutralizantes en el suero de un animal, mediante la titulación de una solución de virus preincubada con diluciones de un suero problema. Este ensayo resulta muy útil a la hora de estudiar el estado de protección de una población frente a un virus. En el caso concreto de los torovirus, en la bibliografía se ha descrito para el análisis de sueros de cerdos, terneras y caballos (Weiss y col., 1984; Brown y col., 1988; Liebermann, 1990; Van Kruiningen y col., 1992), siempre utilizando el virus BEV y aprovechando la reactividad cruzada que existe entre los torovirus de las distintas especies. En todos estos trabajos la titulación del virus se realizó por dilución límite y los ensayos de neutralización por inhibición del efecto citopático, sin embargo, en nuestro laboratorio se puso a punto la titulación del virus BEV por unidades formadoras de placa (ufp) (Garzón, A. y col., datos no publicados), lo que permite un análisis más reproducible de los resultados.

En primer lugar quisimos descartar la posibilidad de que, anticuerpos frente a otros virus relacionados, pudieran neutralizar la infectividad de BEV. Así, llevamos a cabo ensayos de neutralización de la infectividad de BEV utilizando los sueros de cerdo específicos de PRRSV y PRCV (anti-PRRSV y anti-PRCV, respectivamente), el suero Serotec, el suero policlonal de BEV (anti-BEV) como control positivo y el suero spf como control negativo. Además, se realizó el ensayo de neutralización para los virus TGEV y PRRSV con estos mismos sueros. Este análisis, se llevó a cabo con tres diluciones de cada uno de los sueros y siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 9.3.3 de materiales y métodos.

Como se observa en la figura 31, el suero Serotec además de neutralizar a BEV, neutralizó la infectividad de PRRSV y de TGEV (panel A). Sin embargo, los sueros anti-PRCV (panel B) y PRRSV (panel D) no neutralizaron BEV, aunque hay que señalar que el suero anti-PRRSV tampoco neutralizó la infectividad del propio PRRSV. Por otra parte, el suero anti-BEV no neutralizó ni TGEV ni PRRSV. Estos resultados demuestran que no hay reactividad cruzada

entre los torovirus y los virus relacionados TGEV y PRRSV y que el suero comercial de cerdo Serotec contiene anticuerpos específicos frente a estos tres virus, como ya se había visto por ELISA y *western-blot* (Figura 28).

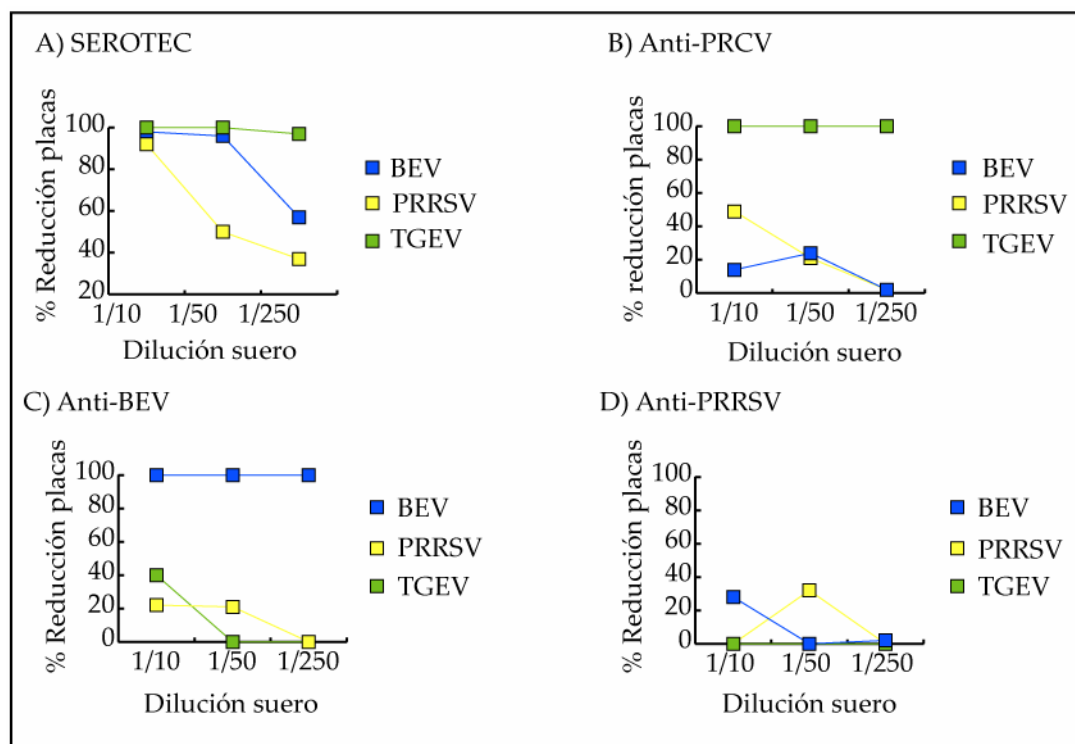


Figura 31. Ensayo de neutralización de los virus BEV, PRRSV y TGEV por los sueros Serotec (A), anti-PRCV (B), anti-BEV (C) y anti-PRRSV (D).

Para poner a punto el ensayo de neutralización, quisimos determinar el título exacto de anticuerpos neutralizantes de los sueros control Serotec y spf de forma que éstos nos sirvieran como controles positivo y negativo, respectivamente, en el análisis de los sueros de cerdo de las granjas. Para ello, llevamos a cabo el ensayo de neutralización utilizando diluciones seriadas 1:2 de los sueros desde 1:4 hasta 1:4096.

Como se observa en la figura 32, el suero spf no neutralizó a BEV a ninguna dilución. Por su parte el suero Serotec sí neutralizó a BEV y a partir de su curva de neutralización calculamos el título de anticuerpos neutralizantes del suero como la inversa de la dilución menor del suero que causa una reducción del 50% en el número de placas de lisis (PDD_{50}) según la fórmula de Langford (Langford y Stanton, 1981) (ver materiales y métodos). Según esta fórmula el título de anticuerpos neutralizantes del suero Serotec sería de 192.

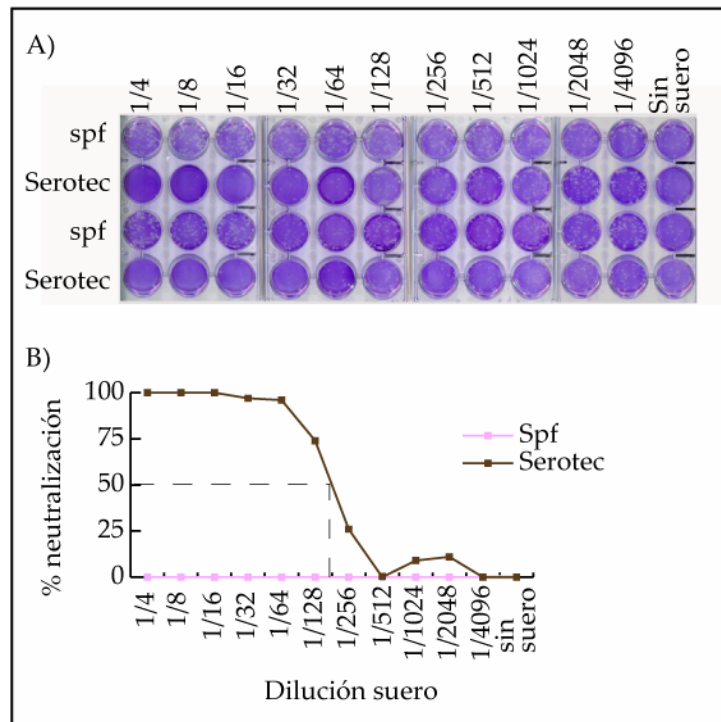


Figura 32. Neutralización de la infectividad de BEV por los sueros de cerdo Serotec y spf. En el panel A se muestra el ensayo de neutralización en las placas de cultivo donde puede observarse la reducción en el número de placas de lisis con el suero de cerdo Serotec frente al suero spf. En la gráfica del panel inferior se representan los valores del porcentaje de neutralización frente al control sin suero, obtenidas con las distintas diluciones de los sueros Serotec y spf.

Una vez establecidas las condiciones del ensayo de neutralización decidimos analizar 10 sueros de cada una de las granjas. El ensayo se llevó a cabo de igual forma que el experimento anterior. Para facilitar la comparación entre los resultados de ELISA y de neutralización el título de anticuerpos neutralizantes se representó como el Log_2 del valor de PDD_{50} .

Como se observa en la figura 33.A y como habíamos visto en el ensayo anterior, el suero spf no neutralizó el virus BEV, en cambio, el suero Serotec neutralizó el virus BEV con un título de 7,57 ($\text{Log}_2 192$). Los sueros procedentes de la granja de Navarra mostraron niveles bajos de anticuerpos neutralizantes, mientras que los sueros de Aragón dieron valores altos de neutralización, algunos incluso superiores a 12 ($\text{Log}_2 4096$). En los sueros de Galicia se obtuvo mayor variedad de resultados con 7 sueros con títulos altos de anticuerpos neutralizantes y 3 con títulos bajos. A partir de la comparación de los resultados obtenidos por ELISA y *western-blot*, habíamos establecido un punto de corte a partir de una D.O. de 0,7 en ensayos de ELISA. Según este primer criterio, un suero con un valor de ELISA inferior a 0,7 sería negativo por *western-blot*. Los sueros JA1, JA3, JA5, JA8, JA10 y JA13 resultaron negativos según este criterio. A partir del análisis por neutralización de la infectividad viral podemos observar cómo los sueros JA5 y JA10 neutralizaron BEV con títulos similares a Serotec y por lo tanto serían positivos por este ensayo. El suero JA13 no se analizó por neutralización. Por su parte los sueros JA1, JA3 y JA8 no neutralizaron al virus por encima de una dilución 1:8 del suero por lo que, teniendo en cuenta los valores correspondientes obtenidos por ELISA para estos sueros y su falta de reactividad por *western-blot*, consideramos un valor de neutralización igual

o inferior a 3 ($\log_2 8$) como un valor negativo de neutralización. Este mismo punto de corte se ha utilizado en trabajos previos de neutralización de BEV por sueros porcinos (Kroneman y col., 1998), equinos (Liebermann, 1990) y en otros ensayos para otros virus (Zhang y col., 2005).

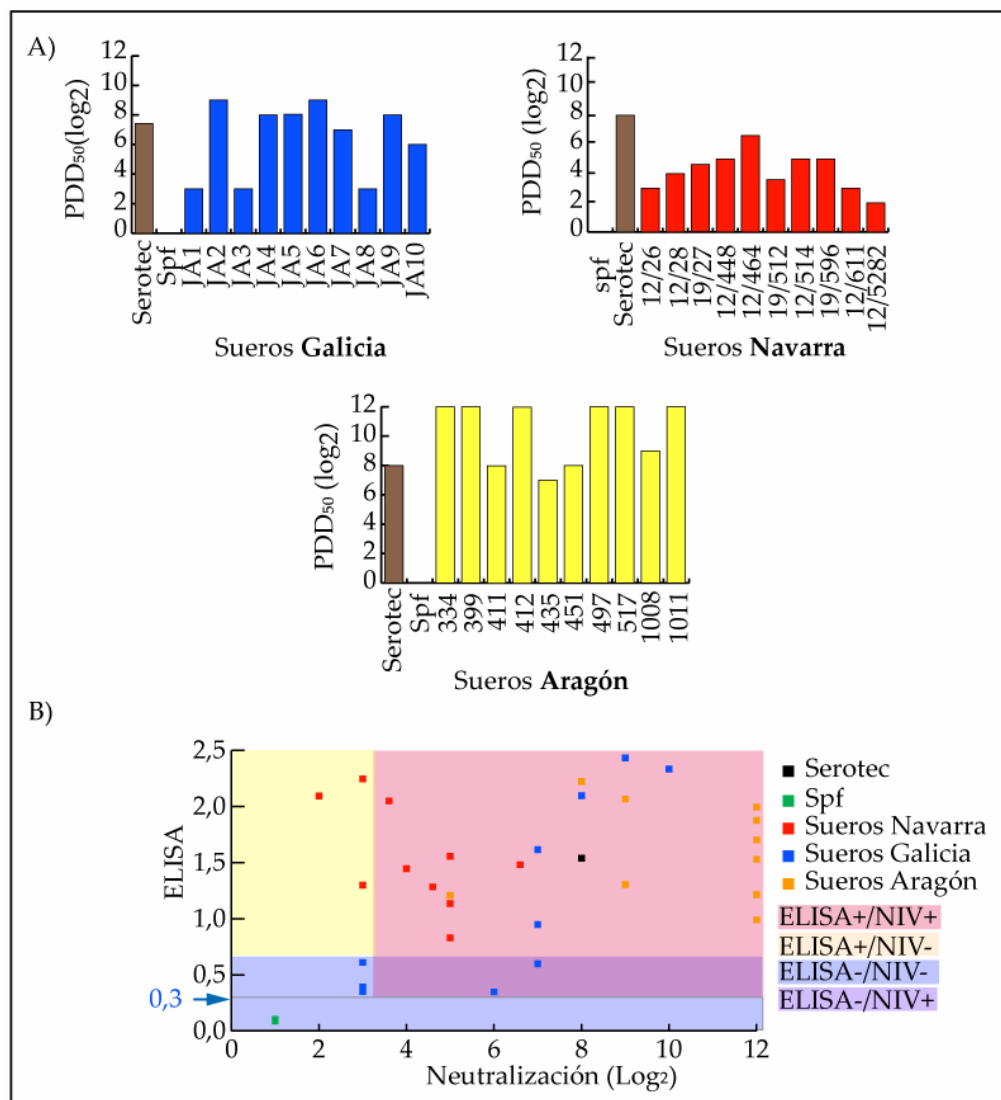


Figura 33. A) Análisis mediante ensayo de neutralización de la infectividad de BEV de los sueros de cerdos de Galicia, Navarra y Aragón. B) Distribución de los valores obtenidos mediante ELISA y neutralización para los sueros de cerdo de las distintas granjas. El color de los puntos indica la procedencia del suero. El valor de Serotec se indica con un punto negro y el del suero spf con un punto verde. En el eje de ordenadas se muestran los valores de D.O._{492nm} obtenidos por ELISA mientras que en el eje de abscisas se muestran los títulos de anticuerpos neutralizantes expresados como el $\log_2 PDD_{50}$.

Con estos valores de neutralización, podemos representar ahora la distribución de los valores obtenidos con cada suero en ELISA y neutralización (Figura 33.B) y establecer un punto de corte de valores verdaderos negativos de ELISA en 0,3. No se encontró ningún suero, excepto el control negativo spf, con un valor de ELISA inferior a 0,3. Entre los valores de 0,3 y

0,7 encontramos tanto sueros positivos como sueros negativos por neutralización, por lo que los sueros con una reactividad por ELISA entre estos valores los consideramos dudosos, a la espera de un ensayo complementario que confirme la presencia o la ausencia de anticuerpos frente a PToV. Por último, estableceríamos un segundo punto de corte de verdaderos positivos a partir de un valor de ELISA superior a 0,7, donde se demostraría la presencia de anticuerpos frente a PToV, al menos mediante *western-blot*, ya que como se puede observar en la figura 33.B, algunos sueros de Navarra con valores de ELISA superiores a 0,7 y positivos por *western-blot* resultaron negativos por neutralización. Este resultado indica que, aunque estos sueros poseen anticuerpos frente a la proteína N carecen de anticuerpos neutralizantes. En cualquier caso, los puntos de corte establecidos deberán ser ajustados conforme se analicen nuevos sueros y una vez se disponga de un número estadísticamente significativo de sueros positivos y sueros negativos, se podrá determinar con mayor precisión el valor de corte del ensayo de ELISA, así como los parámetros de especificidad y sensibilidad del ensayo.

4.2.4. ANÁLISIS MEDIANTE HEMOAGLUTINACIÓN

Como se ha comentado anteriormente, la técnica de diagnóstico por neutralización viral es laboriosa y de difícil aplicación para un número elevado de muestras. Por ello, quisimos evaluar la posible utilización de la técnica de inhibición de la hemoaglutinación, como alternativa a la neutralización viral. Esta técnica se ha utilizado anteriormente como método de diagnóstico serológico en estos virus para el análisis de sueros equinos, bovinos y humanos utilizando preparaciones de virus BEV (Zanoni y col., 1986), BToV (Hoet y col., 2002; Hoet y col., 2003) y de HToV (Duckmanton y col., 1997) purificados a partir de muestras de heces. En nuestro caso, al carecer de virus PToV purificado decidimos utilizar virus BEV purificado y aprovechar la reactividad cruzada entre las distintas especies de los torovirus.

Según está descrito, BEV aglutina eritrocitos de conejo y humanos del grupo O (Zanoni y col., 1986). En primer lugar, determinamos el título de unidades de hemoaglutinación por mililitro de una preparación de virus BEV purificado, con un título de infectividad de $4,5 \cdot 10^8$ ufp/ml, siguiendo el protocolo descrito en el apartado 7.6 de materiales y métodos. Para ello, se incubaron diluciones seriadas del virus con suspensiones al 2% y al 4% de eritrocitos de conejo o humanos del grupo O.

El título de un virus en unidades de hemoaglutinación se define como el recíproco de la dilución menor que causa la aglutinación total de los eritrocitos. Como se observa en la figura 34.A, la preparación de virus BEV utilizada es capaz de aglutinar ambos tipos de eritrocitos hasta una dilución 1:256, por lo que el título en unidades de aglutinación (UH) en esta

preparación de virus es de 256 UH en 50 μ l. En la figura 34.A parece que al utilizar eritrocitos humanos a una concentración del 1%, se obtiene un título mayor de hemoaglutinación, sin embargo, esto es debido a que es más difícil apreciar la aparición del botón de eritrocitos en el fondo del pocillo que determina el final de la hemoaglutinación. Esto unido a que los eritrocitos humanos no son tan accesibles como los de conejo, nos decidió a utilizar una suspensión al 2% de eritrocitos de conejo en nuestros ensayos.

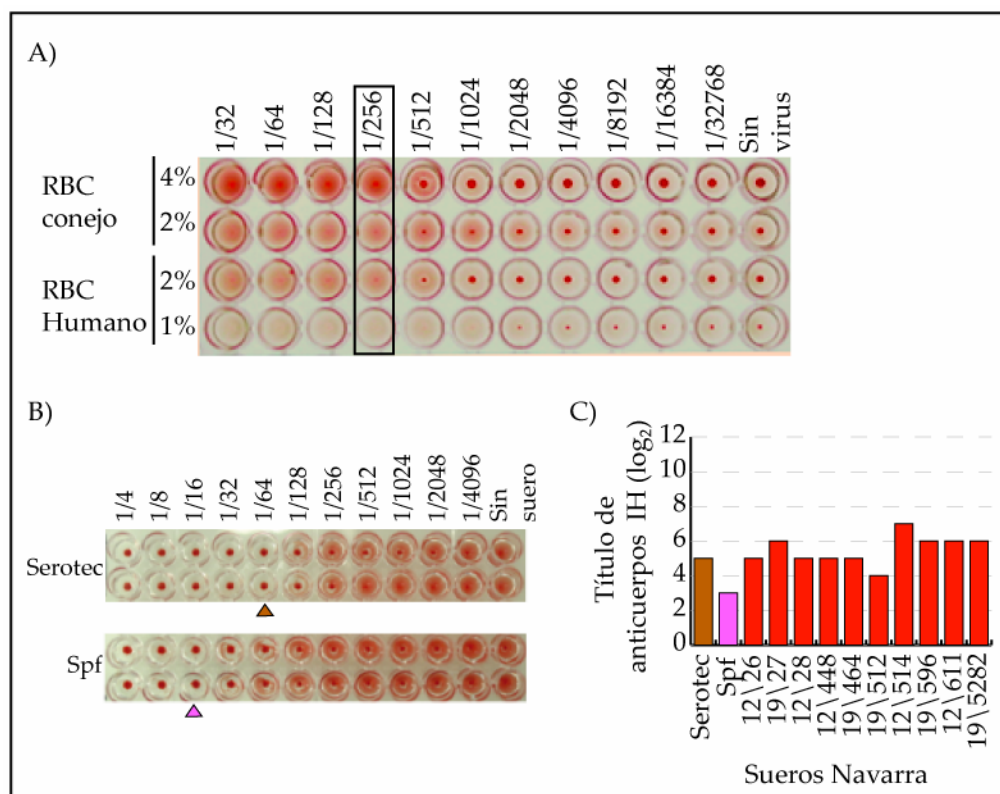


Figura 34. A) Titulación de BEV purificado por unidades de hemoaglutinación. B) Ensayo de inhibición de la hemoaglutinación con los sueros porcinos Serotec y un suero de un animal spf. C) Análisis de los sueros de Navarra mediante el ensayo de inhibición de la hemoaglutinación. El título de anticuerpos se ha expresado como el Log₂ de la inversa de la dilución mayor del suero que inhibe la hemoaglutinación al 100%.

Una vez titulado el virus, se llevó a cabo el ensayo de inhibición de la hemoaglutinación con los sueros de Navarra siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 9.3.4 de materiales y métodos. En la figura 34.B se muestra el resultado del ensayo realizado con los sueros de cerdo Serotec y spf que sirvieron como control positivo y negativo, respectivamente. En la figura 34.C, se muestran los resultados del análisis de los sueros procedentes de Navarra. El título de anticuerpos que inhibieron la hemoaglutinación (IH) se expresó como el log₂ de la mayor dilución del suero capaz de inhibir la hemoaglutinación.

La técnica de inhibición de la aglutinación es una técnica sencilla y específica, sin embargo, en nuestro caso no resultó muy sensible, ya que entre los valores de los controles positivo y negativo, solo hay dos diluciones de diferencia (Figura 34.B). Seguramente esta baja sensibilidad se deba a una baja reactividad cruzada entre BEV y PToV a nivel de los dominios de la proteína S, responsables de la hemoaglutinación de los eritrocitos. Por ello descartamos esta técnica como alternativa al ensayo de neutralización.

4.3. ANÁLISIS DE UNA SEROTECA DE SUEROS PORCINOS

Una vez establecidos los puntos de corte para los valores de ELISA, decidimos analizar mediante esta técnica, la prevalencia de anticuerpos frente a PToV en una población mayor de animales, por ello analizamos una seroteca de 595 sueros de cerdos procedentes de distintas explotaciones de ganado porcino de Aragón, Cataluña, Murcia y Castilla y León. Esta seroteca fue cedida por la empresa Laboratorios HIPRA (Gerona).

Todas las muestras se analizaron por ELISA frente a la proteína N. Los sueros se analizaron en lotes de 88 animales y en cada placa se analizó en paralelo la reactividad de los sueros de cerdo control Serotec y spf.

El valor de D.O._{492nm} medio obtenido para el suero Serotec fue de $1,9 \pm 0,21$ (n=90) y para el suero spf fue de $0,169 \pm 0,12$ (n=90). De los 595 sueros, un 99% (592/595) mostraron valores positivos (D.O. > 0,7). El porcentaje de sueros dudosos ($0,3 < \text{D.O.} < 0,7$) fue del 1% (3/595) y no se encontró ningún suero negativo (D.O. < 0,3) (Figura 35).

Se analizaron en paralelo mediante neutralización los sueros de que resultaron dudosos por ELISA (97, 51 y 72) y el suero 44, que dio un valor de D.O. ligeramente superior a 0,7 y por lo tanto, había sido considerado positivo. Todos estos sueros fueron positivos por este ensayo (Figura 35.B), por lo que el porcentaje de sueros positivos en la seroteca de 595 sueros es del 100%. Estos resultados demuestran la alta prevalencia de anticuerpos frente a PToV en sueros de cerdos procedentes de granjas españolas.

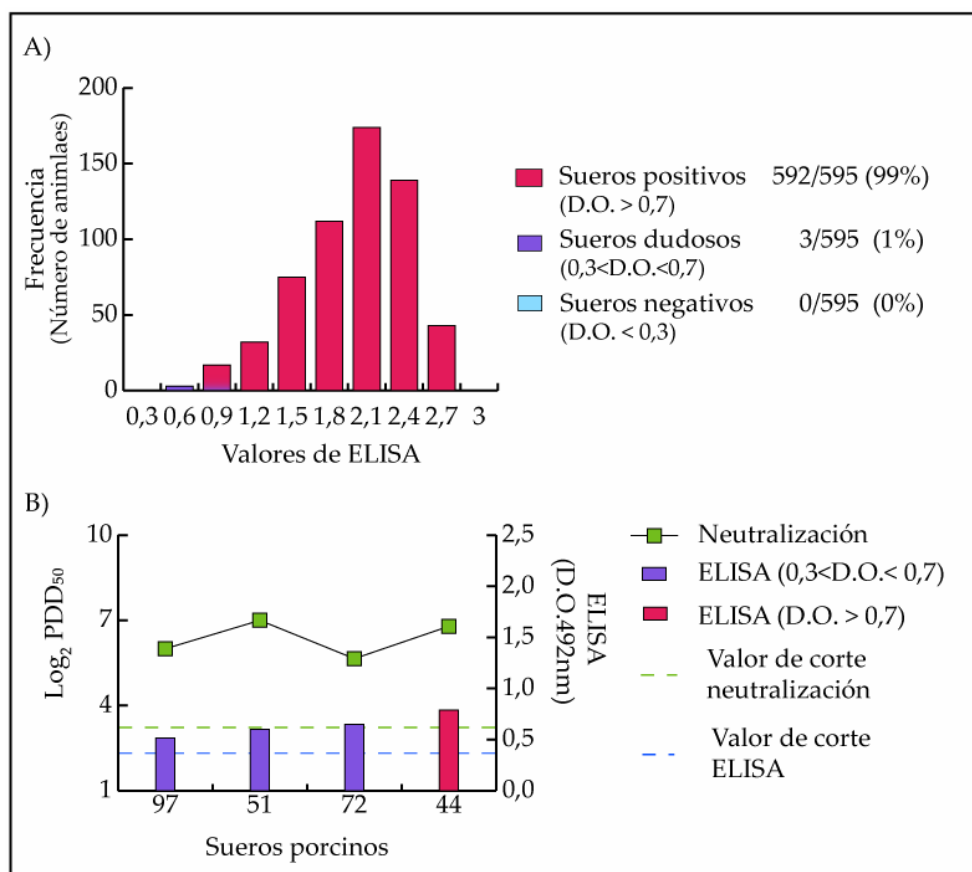


Figura 35. A) Distribución de valores de ELISA frente a la proteína N de una seroteca de 595 sueros procedentes de distintas zonas ganaderas de España. **B) Análisis mediante el ensayo de neutralización** de los sueros con valores de D.O._{492nm} por ELISA entre 0,3 y 0,7 (dudosos).

4.4. ESTUDIO LONGITUDINAL EN SUEROS DE LECHONES

Una vez establecida la prevalencia de anticuerpos frente a PToV en suero de cerdos adultos, quisimos hacer un seguimiento de la aparición de los anticuerpos frente al virus en sueros de lechones desde su nacimiento. Para ello llevamos a cabo un estudio longitudinal utilizando una seroteca cedida por el Dr. Joaquim Segales del *Centre de Recerca en Sanitat Animal* (CReSA, Barcelona). Esta seroteca representa cuatro granjas de Cataluña a las que se ha denominado como 1, 3, 5 y 7 y contiene un total de 160 lechones de distintas camadas en grupos de 4 lechones por camada y 10 camadas por granja. Los sueros habían sido recogidos en las semanas 1, 3, 7, 11 y 15 de vida de cada lechón. Además se disponía de muestras de suero de las madres ($n=40$) de cada una de las camadas tomadas también en la semana 1 de vida del lechón.

Los sueros se analizaron por ELISA frente a la proteína N de PToV a una dilución 1:100 y, en cada ensayo, se analizaron en paralelo los sueros de los lechones de una granja junto con sus respectivas madres, así como los sueros Serotec y spf como controles.

Todas las madres mostraron valores de ELISA superiores a 0,3 y sólo 8 de ellas tuvieron un valor inferior a 0,7 (Figura 36.A). El análisis por neutralización demostró que los sueros de todas ellas eran positivos (datos no mostrados).

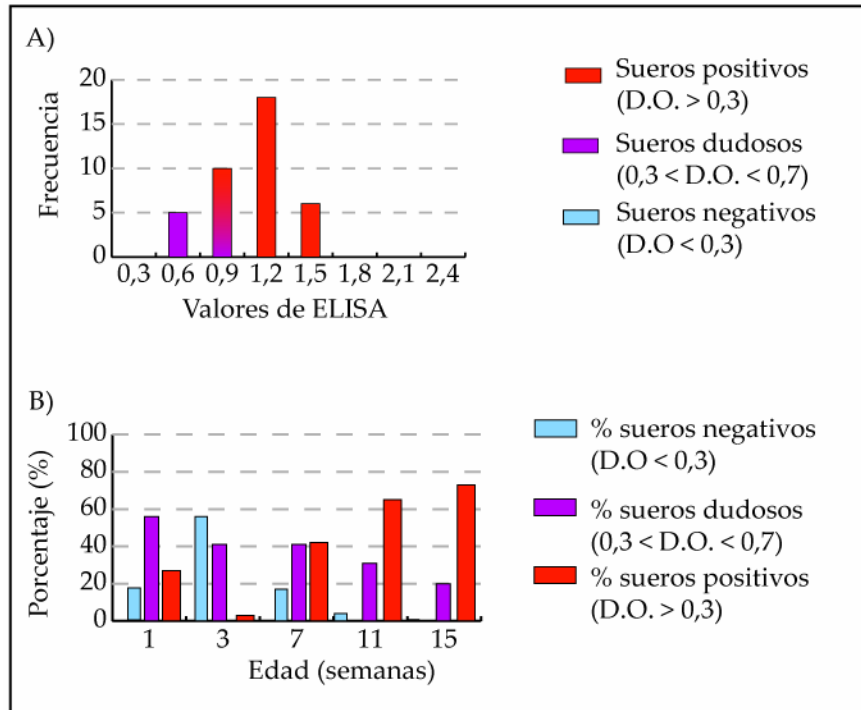


Figura 36. Análisis de la presencia de anticuerpos frente a torovirus en los sueros de 40 cerdas reproductoras y de sus lechones a lo largo de las primeras semanas de vida. A) Distribución de los valores de ELISA de los sueros de las 40 cerdas incluidas en el estudio. B) Porcentaje de sueros positivos, negativos y dudosos obtenidos por ELISA sobre 160 lechones entre las semanas 1-15 de vida. Los sueros se consideraron positivos cuando su valor de ELISA frente a la proteína N era igual o superior a 0,7 (D.O. \geq 0,7), negativos cuando su valor de ELISA fue inferior a 0,3 (D.O. < 0,3) y dudosos cuando su valor de ELISA fue superior a 0,3 pero inferior a 0,7 (0,3 < D.O. < 0,7).

Por su parte todos los lechones mostraron, en la primera semana de vida, una reactividad similar o inferior a las de su madre. Así el 26% de los lechones fueron positivos (Figura 36.B) y el 56% dudosos, mientras que solo un 18% resultó negativo. Los anticuerpos maternos descendieron en la semana 3 de vida de los lechones y tan solo el 3% de los lechones mostraron valores positivos por ELISA, mientras que el 57% tuvieron valores inferiores a 0,3 lo que indica que a las 3 semanas de vida desaparece la inmunidad materna en la mayoría de los lechones. Sin embargo, en la semana 7 el 42 % de los lechones presentaron, de nuevo, valores positivos de ELISA y solo un 28% de los lechones fueron negativos, sugiriendo que la ventana de tiempo en la que los lechones son más susceptibles a la infección por PToV está entre las semanas 3 y 7 de vida. En las semanas 11 y 13 el número de animales con valores positivos aumentó hasta el 64% y el 70%, respectivamente y solo un 1% se mantuvo en valores negativos

en la semana 15. Estos resultados sugieren que una vez los anticuerpos maternos desaparecen, los lechones son susceptibles a la infección y la mayoría de ellos se infectan durante las semanas siguientes al destete. No se observaron diferencias ni en las respuestas inmunes de los lechones ni en el título de anticuerpos maternos en función de la edad de la madre.

También, se analizó mediante un ensayo de neutralización la evolución del título de anticuerpos neutralizantes de 4 lechones y sus respectivas madres (figura 37). Se eligieron estos lechones como representativos de 4 tendencias en la evolución del título de anticuerpos. En el 94% de los lechones la evolución del título de anticuerpos se ajustó a una de estas tendencias.

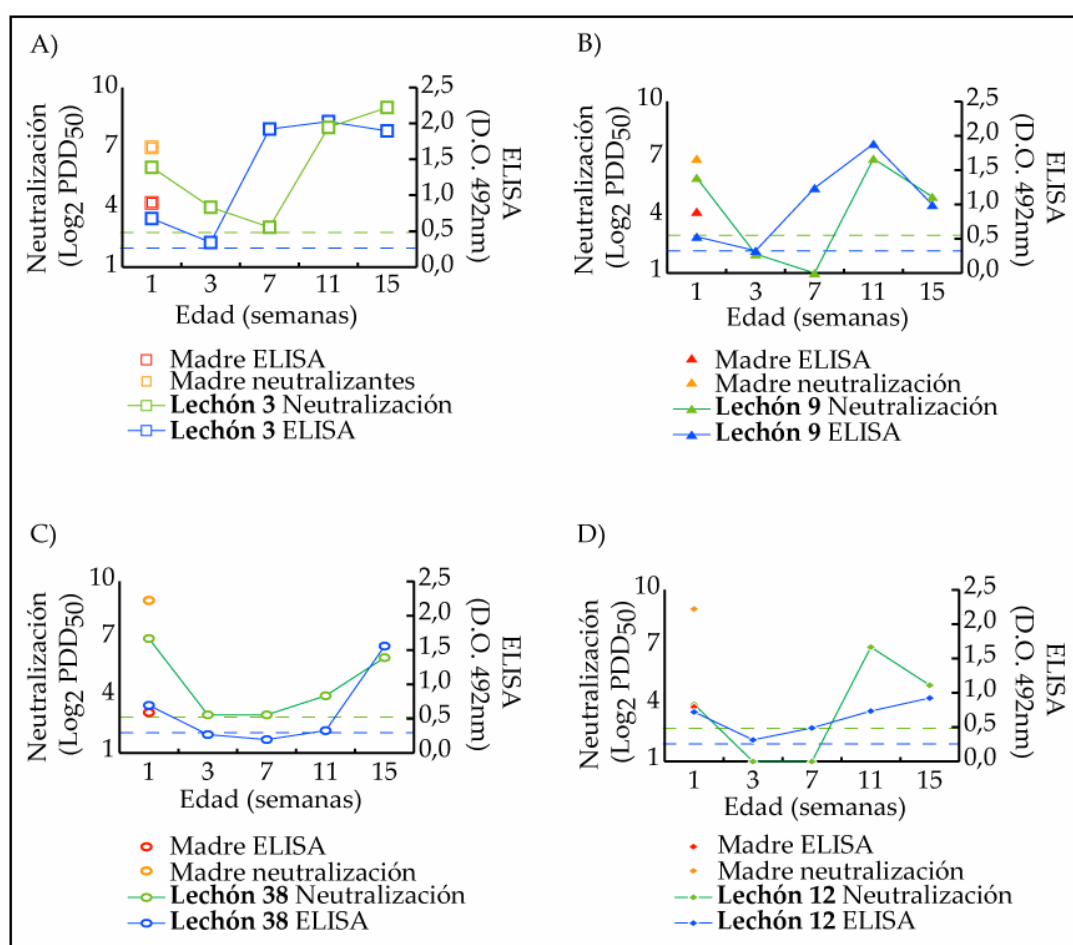


Figura 37. Evolución de los títulos de anticuerpos frente a la proteína N obtenidos por ELISA (azul) y de los títulos de anticuerpos neutralizantes obtenidos mediante ensayo de neutralización del BEV (verde), para los lechones 3, 9, 38 y 12. También se compararon estos títulos en el suero de la madre en la semana 1 tanto por ELISA (rojo) como por neutralización (naranja). Las líneas discontinuas indican los valores de corte para sueros negativos por ELISA (azul) y neutralización (verde).

El lechón 3 (Figura 37.A) mostró un título alto de anticuerpos neutralizantes en la semana 1 que no llegaron a desaparecer en la semana 3. Los anticuerpos frente a la proteína N fueron moderados en la primera semana de vida y prácticamente desaparecieron en la semana 3, sin

embargo, en la semana 7 se observó un alto título de anticuerpos que se mantuvo estable durante las 8 semanas siguientes. Por otra parte, como se observa en la figura 37.A el título de anticuerpos neutralizantes no aumentó hasta la semana 11, lo que sugiere que este lechón había perdido los anticuerpos neutralizantes procedentes del suero materno y a la semana 11 ya había desarrollado sus propios anticuerpos neutralizantes. El lechón 9 (figura 37.B) que en la semana 1 tenía un título alto de anticuerpos maternos neutralizantes, los perdió en el curso de dos semanas y en la semana 3 no se detectaron anticuerpos neutralizantes ($\text{Log}_2\text{PDD}_{50}=2$). Los títulos de anticuerpos frente a N, que habían sido bajos en las semanas 1 y 3, aumentaron rápidamente en las semanas 7 y 11, mientras que los anticuerpos neutralizantes se mantuvieron negativos hasta la semana 11. Además, se puede observar como los títulos tanto de anticuerpos frente a N como de anticuerpos neutralizantes descendieron por igual en la semana 15 de vida.

El lechón 38, por su parte (figura 37.C), en la semana 1 de vida recibió anticuerpos maternos tanto frente a la proteína N como neutralizantes, sin embargo, en la semana 3 la protección materna desapareció como demuestran los valores negativos obtenidos por ambos ensayos. En la semana 7 el lechón continuó siendo negativo pero en la semana 11 presentaba anticuerpos frente a la proteína N y especialmente anticuerpos neutralizantes. Ambos títulos aumentaron considerablemente en la semana 15, sugiriendo que la infección se había producido más tarde que en los lechones anteriores y que en la mayoría de los animales del estudio, probablemente entre la semana 7 y la semana 11. Por último, el lechón 12 (figura 37.D) mostró títulos bajos de anticuerpos frente a la proteína N por ELISA en las semanas 3 y 7, y tampoco presentó anticuerpos neutralizantes. En las semanas 11 y 15 el lechón desarrolló tanto anticuerpos frente a N como anticuerpos neutralizantes. El ensayo de neutralización permitió comprobar la presencia de anticuerpos frente al virus en los sueros del lechón en estas semanas, pero no en las semanas anteriores. Este seroperfil de respuesta inmune débil, solo se observó en un 4% de los lechones aunque todos ellos presentaron valores de ELISA positivos en la semana 15.

Los análisis realizados mediante el ensayo de neutralización en un número reducido de sueros de lechones que habían sido considerados dudosos por ELISA, parecen indicar que la mayoría de estos sueros serán positivos según este segundo criterio. Por ello consideramos que conforme analicemos un número estadísticamente significativo de sueros dudosos podremos ajustar con mayor precisión el valor de corte por ELISA que permita diferenciar los sueros positivos de los sueros negativos. Probablemente este punto de corte estará próximo a un valor de 0,3 de densidad óptica.

Los resultados obtenidos nos permiten acotar la ventana de tiempo en la que ocurre la infección por torovirus en la mayoría de los lechones, que correspondería al periodo entre las semanas 3 y 7 de vida. Este dato nos permitirá analizar muestras de heces con mayor probabilidad de éxito en cuanto a la detección de PToV mediante RT-PCR.

5. ADAPTACIÓN DE PToV AL CULTIVO *IN VITRO*

Como se ha comentado anteriormente, PToV no se ha adaptado al crecimiento en cultivo *in vitro*. Puesto que es una herramienta fundamental para poder profundizar en su estudio, nos planteamos la adaptación al crecimiento de PToV-BRES2 en cultivos celulares. Dado que los intentos para adaptar BToV al cultivo *in vitro* en líneas celulares establecidas utilizadas para el crecimiento de otros virus (Hoet y Saif, 2004) han fracasado hasta el momento, nos propusimos intentar el cultivo de PToV en células de epitelio intestinal de cerdo, que son las células dianas del virus de forma natural (Woode y col., 1984). Como estas células no están disponibles de forma comercial, en primer lugar, quisimos obtener cultivos primarios a partir de explantes de intestino de cerdo.

El epitelio intestinal se renueva cada 3-8 días gracias a la presencia de células madre localizadas en las criptas intestinales. Estas células son capaces de dividirse y dar lugar a los distintos tipos celulares que constituyen el epitelio intestinal. Las células en diferenciación emergen desde la cripta hasta alcanzar la superficie del epitelio donde terminan su diferenciación y mueren siguiendo un proceso conocido como apoptosis inducida por desprendimiento. Debido a esta programación, las células epiteliales del intestino no pueden ser explantadas del tejido y cultivadas *in vitro* (Leschelle y col., 2002). Sin embargo, sí que se ha conseguido obtener cultivos de criptas intestinales de bovino (Follmann y col., 2000) y porcino (Leschelle y col., 2002), que han dado lugar a cultivos de células con características morfológicas (microvellosidades) y funcionales (segregación de mucus y capacidad absortiva) similares a las del epitelio intestinal y que pueden ser cultivadas durante algunos pases (Rusu y col., 2005).

Con estos antecedentes nos propusimos aislar criptas intestinales de cerdo con el fin de crecerlas en cultivo y estudiar si eran susceptibles a la infección por PToV. Por los resultados obtenidos en las infecciones experimentales en terneras con BToV, se sabe que los torovirus infectan tanto células del epitelio intestinal como células de las criptas intestinales en yeyuno, ileon y colon (Woode y col., 1984), por lo que, para la extracción de criptas intestinales utilizamos secciones de unos 15 cm de longitud de cada uno de estos tres tramos de intestino de un cerdo sano.

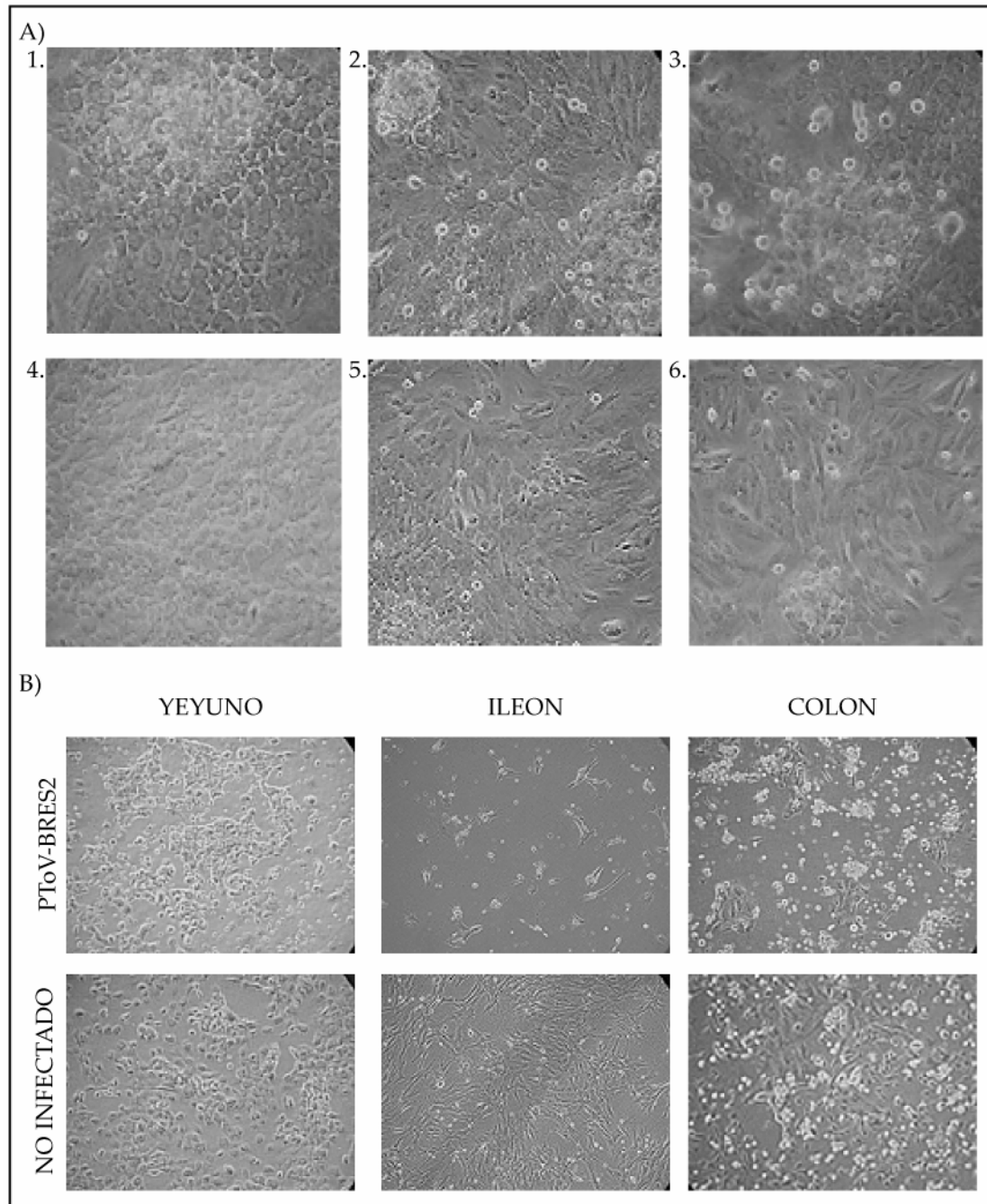


Figura 38. A) Obtención de un cultivo primario de criptas y células epiteliales de intestino de cerdo. Las criptas intestinales se sembraron en presencia de colágeno I y medio de cultivo de criptas. A las 24 horas de cultivo las criptas perdían su morfología y mostraban un aspecto de un cúmulo de células refringentes. A los 3-5 días las monocapas alcanzaron confluencia, con un aspecto de pavimento. B) **Infección de células epiteliales de cerdo con PTov-BRES2.** Se utilizó una dilución 1:2 de la muestra de heces de cerdo PBRES2 en medio DMEM y tras 1 hora de adsorción se retiró el medio y se añadió medio fresco con 2% de FCS. Las imágenes se tomaron a las 24 hpi en el microscopio óptico.

Tras el tratamiento mecánico y enzimático de las secciones de intestino se obtuvo una primera suspensión de células y tras la centrifugación isopícnica en sorbitol al 2% se separaron las células individuales (células epiteliales y fibroblastos) que quedaban en el sobrenadante, de las criptas intestinales que sedimentaban. Las criptas observadas al microscopio presentan

estructuras formadas por cúmulos de células redondas y refringentes, cuya forma recuerda a un tubo de ensayo.

Los sedimentos de criptas de cada uno de los tramos de intestino se resuspendieron en medio de cultivo y se sembraron por separado en frascos de cultivo de 75cm² y se incubaron 1 hora a 37°C. Tras este tiempo, se observó que algunas células no refringentes se adherían a la superficie del frasco mientras que las criptas y algunas células refringentes individuales quedaban en suspensión. Según está descrito (Rusu y col., 2005), las células adheridas corresponden a fibroblastos, mientras que las células epiteliales y las criptas permanecen en suspensión ya que requieren una matriz de colágeno para adherirse. Con esta incubación, se consigue reducir el número de fibroblastos contaminantes en la preparación de los cultivos primarios.

El sobrenadante de células se volvió a recoger y se sembró en otro frasco de cultivo, esta vez en presencia de colágeno I (17 µg/cm²) y se incubó a 37°C. En estas condiciones, a las 24 horas de la siembra, se podían observar las criptas adheridas a la superficie y en algunos casos, células creciendo a partir de ellas. A las 48 horas, las criptas estaban totalmente adheridas a la botella y habían perdido su arquitectura original, observándose como cúmulos de células (Figura 38.A.1, 2 y 3). También se observaron células creciendo de forma radial a partir de las criptas intestinales (Figura 38.A.1) con un aspecto redondeado mientras que las células más alejadas de la cripta mostraban un aspecto más alargado (Figura 38.A.5 y 6). Estas observaciones sugerían una diferenciación progresiva de las células. Al cabo de 3-5 días, se obtuvieron en los tres cultivos, monocapas confluentes de células con un aspecto semejante a un pavimento (Figura 38.A.4), tal como está descrito en la literatura (Rusu y col., 2005).

Conforme avanzaba el número de pases, el ritmo de crecimiento de las células descendió y las criptas intestinales se disgregaron quedando sólo algunas células redondas y refringentes (Figura 38.A.4) que se adherían a la placa y a partir de las cuales se iniciaba de nuevo el crecimiento. Se congelaron alícuotas de células desde el pase 1 hasta el pase 7 de cada uno de los explantes de células.

Una vez conseguimos aislar criptas intestinales y mantenerlas en cultivo, quisimos ensayar si el virus PToV-BRES2 era capaz de infectar estas células. Para ello, a partir del pase 3, se sembraron en paralelo y por duplicado células correspondientes a los tres tramos de intestino en placas de 6 pocillos. Cuando estas células alcanzaron el 80% de confluencia se infectaron con 150µl de sobrenadante de heces y se suplementaron con 350 µl de medio DMEM al que se añadió una mezcla de antibióticos 10 veces más concentrada de lo habitual, y se incubaron durante una hora a 37 °C. A continuación se retiró el medio de infección y se

añadió medio de cultivo fresco también con antibióticos a una concentración 10 veces superior a la normal y FCS al 10%. Como control negativo de infección se utilizó PBS en lugar del inóculo ya que es la solución en la que se tratan las muestras de heces a su llegada al laboratorio (ver materiales y métodos).

A las 24 hpi, las células de los tres cultivos a los que se les había añadido la muestra de heces con PToV-BRES2 presentaban un aspecto redondeado y refringente mientras que en los controles negativos las células mostraron un aspecto normal con células alargadas o redondeadas (Figura 38.B). En el caso del íleon, gran parte de las células se desprendieron a consecuencia de la “infección”. Las células se mantuvieron 24 horas más en cultivo y a continuación se recogió tanto el sobrenadante como las células, para analizarlos.

Para continuar con la adaptación de PToV al cultivo utilizamos 200µl del sobrenadante de cada cultivo infectado para infectar nuevas monocapas de células. 48 h después de esta segunda inoculación, no se observó efecto alguno en las células, a pesar de lo cual, recogimos de nuevo tanto los sobrenadantes como las células. Este proceso se repitió hasta 7 veces, sin que se observara efecto citopático en ningún caso.

Para determinar si había habido infección en alguno de los pases, se analizó mediante RT-PCR la presencia de RNA viral tanto en los sobrenadantes como en los extractos celulares utilizando los oligonucleótidos ToV-M5'-3', así como mediante snRT-PCR utilizando los oligonucleótidos NI1, NE2 y NI2. No se obtuvo amplificación en ningún caso.

DISCUSIÓN

La información epidemiológica disponible actualmente acerca de la importancia de PToV en el mundo es muy escasa y concretamente en España, aún no ha estudiado su presencia ni tampoco la de otros torovirus descritos que afectan a las poblaciones equinas, bovinas o humanas. Los primeros estudios sobre PToV se llevaron a cabo mediante microscopía electrónica en muestras de heces de cerdos con diarrea (Scott y col., 1987; Durham y col., 1989; Penrith and Gerdes 1992) y mediante ensayos de neutralización de BEV con sueros de cerdo (Brown y col., 1988; Liebermann 1990). A pesar de que estos estudios serológicos indicaban una alta prevalencia de anticuerpos frente a PToV, la evidencia molecular de la existencia de torovirus porcino no se obtuvo hasta 1998 cuando, mediante RT-PCR, se detectó la presencia de PToV (aislado P-Markelo) en muestras de heces de lechones en una granja de Holanda (Kroneman y col., 1998). Hasta la fecha, únicamente se han descrito 4 aislados más de PToV, un aislado en Hungría (P-78) (Matiz y col., 2002) y tres en Italia (P-4, P-9 y P-10) (Smits y col., 2003). El torovirus porcino aún no se ha adaptado al cultivo *in vitro*, lo cual ha sido un impedimento importante para el conocimiento del virus y el desarrollo de herramientas de diagnóstico que permitan abordar un estudio epidemiológico. Los análisis tanto por microscopía electrónica como por ensayos de neutralización de la infectividad viral, son muy laboriosos y de difícil aplicación para el estudio de un elevado número de muestras, por lo tanto, es necesario desarrollar nuevas herramientas de diagnóstico específicas para torovirus porcino que permitan conocer la verdadera relevancia del virus en poblaciones de cerdos.

1. DESARROLLO DE MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR PARA PToV

En este trabajo se describe el desarrollo de un método de RT-PCR para la detección de torovirus en muestras de heces. Para la optimización de los métodos de RT-PCR se utilizó BEV como modelo, ya que este se puede crecer en células en cultivo. El sistema de RT-PCR basado en la amplificación de un fragmento de la ORF M utilizando los oligonucleótidos ToV-M5'-3' cuyas secuencias están conservadas en todos los torovirus descritos, demostró tener un límite de detección 100 veces inferior que el método utilizado anteriormente para el diagnóstico de PToV (Kroneman y col., 1998), basado en secuencias de la región NTR del genoma de BEV.

Utilizando este método de RT-PCR pudimos detectar la presencia de un nuevo aislado de PToV en una muestra de heces de cerdo procedente de Brescia (Italia) (PToV-BRES2) y otro aislado de BToV en una muestra de heces de ternera también procedente de Brescia (BToV-BRES2). Por tanto, este sistema no sólo es más sensible que los descritos anteriormente para el

diagnóstico de PToV sino que es más versátil, ya que podría ser utilizado para el diagnóstico molecular tanto de PToV como de BEV y BToV.

Se ha descrito que tras la infección por PToV la liberación de virus en las heces a niveles detectables por RT-PCR ocurre en una ventana de tiempo muy corta (1-9 días) (Kroneman y col., 1998). Por ello, una vez dispusimos de un aislado porcino de torovirus y con el objetivo de desarrollar un método de RT-PCR más sensible, optamos por una estrategia de amplificación semianidada. Diseñamos una nueva combinación de oligonucleótidos que hibridarían específicamente en una región del gen N de PToV pero no de BEV, evitando así, la posible aparición de falsos positivos debido a posibles contaminaciones por BEV, ya que éste se utiliza como modelo en otros estudios del laboratorio.

El método de RT-PCR semianidada con los oligonucleótidos NI1, NE2 y NI2 fue 1000 veces más sensible que el método de RT-PCR simple utilizando los oligonucleótidos NI1-NE2 o los oligonucleótidos ToV-M5'-M3'. Esta estrategia de RT-PCR nos permitió detectar la presencia de PToV en una muestra procedente de una granja española (PToV-ZAR2). El aislado PToV-ZAR2 es el primer torovirus porcino que se detecta en España. En la secuencia del fragmento del gen N amplificado se observaron diferencias respecto al aislado PToV-BRES2 y mutaciones únicas para este aislado. Estas diferencias junto con la utilización de controles negativos en cada uno de los pasos de la reacción confirman la validez del resultado. Desafortunadamente, no conseguimos amplificar otras regiones del genoma, probablemente debido a la baja concentración del virus en la muestra.

Por lo tanto, disponemos de dos sistemas de diagnóstico molecular por RT-PCR para PToV con los que podemos abordar el análisis de muestras de heces procedentes de explotaciones porcinas donde se estén produciendo casos de diarrea de etiología desconocida, y determinar, así la importancia de PToV como agente causante de infecciones entéricas en el ganado porcino en España.

2. DESARROLLO DE SISTEMAS DE DIAGNÓSTICO SEROLÓGICOS.

Los anticuerpos generados durante la respuesta inmune frente a un patógeno permanecen en el suero del individuo durante varias semanas, por lo que la detección de estos anticuerpos en muestras de sueros, permite obtener información acerca de la presencia de un patógeno en el ambiente de una población.

En este trabajo hemos descrito el desarrollo de un sistema de ELISA para la detección de anticuerpos frente a PToV utilizando como antígeno la proteína N de PToV-BRES2, expresada en células de insecto mediante el baculovirus recombinante rBac-PToV-N y purificada mediante

cromatografía de afinidad. La proteína de la nucleocápsida (N) de los torovirus y en general de los nidovirus, es mayoritaria en la partícula viral y es, además, altamente inmunogénica. Por ello, esta proteína se ha utilizado para el desarrollo de sistemas de detección de anticuerpos frente al virus del síndrome agudo respiratorio (SARS-CoV) (Wang y col., 2005), al virus de la diarrea epidémica de cerdo (PEDV) (Hou y col., 2007) o al virus del síndrome reproductivo respiratorio de cerdo (PRRSV) (Denac y col., 1997; Bogdanova y col., 2007) entre otros.

El sistema de baculovirus recombinantes se ha utilizado anteriormente para la obtención de antígenos para el desarrollo de métodos de diagnóstico para otros virus, como el virus de la artritis de caballo (EAV) (Hedges y col., 1998), el SARS-CoV (Saijo y col., 2005), el rotavirus bovino (Tsunemitsu y col., 2005) y el virus de la peste porcina africana (VPPA) (Gallardo y col., 2006). La utilización de proteínas recombinantes expresadas en sistemas heterólogos, para el desarrollo de métodos de diagnóstico serológico, presenta importantes ventajas respecto a la utilización de un virus completo obtenido en cultivo celular. Concretamente en el caso de PToV, la expresión de sus proteínas en sistemas heterólogos es la única estrategia que nos permite obtener antígenos de PToV en gran cantidad de una forma sencilla, barata y segura, ya que aún no se ha descrito una línea celular en la que se pueda cultivar el virus *in vitro*, como sucede en el caso de BEV (Weiss and Horzinek 1986), o un sistema de infección experimental en animales, como sucede con BToV (Woode y col., 1982). Además, al purificar las proteínas recombinantes por cromatografía de afinidad eliminamos el material celular contaminante que puede encontrarse en preparaciones de virus purificado mediante métodos físico-químicos.

Para la estandarización del ensayo de ELISA, se optimizaron las cantidades de antígeno, la solución de tapizado y la dilución de los sueros, utilizando como sueros modelo un suero de cerdo adulto positivo para PToV cedido por el Dr. Lavazza (anti-BRES) y un suero comercial de cerdo (Serotec), compuesto por una mezcla de sueros de cerdos adultos del Reino Unido aparentemente sanos que resultó ser positivo para PToV, TGEV y PRRSV por ELISA, *western-blot* y neutralización. Como control negativo utilizamos sueros de cerdos libres de patógenos. Durante la puesta a punto del ensayo de ELISA y posteriormente en el análisis de los sueros procedentes de las granjas de Aragón y Navarra, se observó que estos sueros presentaban reactividad frente a la BSA no sólo en ELISA, sino también en *western-blot*. Este fenómeno ya ha sido descrito anteriormente por otros autores (Escribano y col., 1989; Denac y col., 1997), sin embargo el origen de esta reactividad no está muy claro. La reactividad frente a la BSA podría reflejar una hipersensibilidad de los cerdos debido a la presencia de BSA como contaminante en las preparaciones de vacunas basadas en virus cultivados *in vitro* (Frazatti-Gallina y col., 2004). En este sentido, los sueros que mostraron mayor reactividad frente a la BSA, corresponden a

cerdos adultos probablemente vacunados, mientras que los sueros de Galicia, que no reaccionaron frente a la BSA, correspondían a lechones de 6 a 8 semanas no vacunados.

Otros autores han sugerido que esta reactividad frente a la BSA, podría deberse a una incorrecta toma de muestras de los sueros o una mala conservación de los mismos (Tsunemitsu y col., 2005; Gallardo y col., 2006). En nuestro caso, los sueros de Aragón y Navarra presentaron, a su llegada al laboratorio, una coloración rojiza-marrón, que sugería un alto grado de hemólisis y según se nos informó por parte del personal de las granjas, la sangre de los animales fue extraída mediante un corte en la base de la cola del animal. En contraposición a estos sueros, los sueros de la granja de Galicia, que presentaron un aspecto limpio, no mostraron reactividad frente a la BSA.

Con estos antecedentes y teniendo en cuenta que aquellos sueros que mostraron una reactividad similar por ELISA frente a la BSA y la proteína N, eran claramente positivos frente a la proteína N por *western-blot*, concluimos que la BSA no servía como control para determinar reactividades inespecíficas de los sueros frente a un antígeno irrelevante, por lo tanto, decidimos prescindir de la BSA en los siguientes ensayos de ELISA.

La evaluación de la sensibilidad y especificidad de un método de diagnóstico requiere de la utilización de sueros de referencia de animales infectados y no infectados o libres de anticuerpos en un número estadísticamente significativo que pueda representar a toda una población de individuos. Sin embargo, para PToV no existen sueros de referencia puesto que no se ha llevado a cabo ningún estudio epidemiológico en el que se haya utilizado un gran número de sueros. Por ello, para evaluar el ensayo de ELISA basado en la proteína N de PToV como un posible método de diagnóstico serológico, analizamos la presencia de anticuerpos frente a la proteína N de PToV en 45 muestras de suero de cerdo procedentes de tres granjas de distintas zonas de producción ganadera porcina en España, como son Galicia, Navarra y Aragón con la esperanza de obtener tanto sueros positivos como negativos. El análisis lo llevamos a cabo mediante ELISA y otras dos técnicas alternativas, *western-blot* y neutralización de la infectividad viral de BEV ya que este método ha sido utilizado anteriormente para la detección de anticuerpos frente a PToV (Kroneman y col., 1998), BEV (Liebermann 1990; Kroneman y col., 1998) y BToV (Weiss y col., 1984).

En todos los ensayos se utilizaron como control el suero comercial de cerdo Serotec y una mezcla de sueros de cerdos spf. Los valores medios de densidad óptica obtenidos mediante ELISA en un total de 90 ensayos, realizados cada uno de ellos por duplicado y en distintos días, fueron $1,91 \pm 0,21$ para Serotec y $0,169 \pm 0,12$ para el suero spf. Esto sugiere que el ensayo de ELISA desarrollado es muy reproducible.

A partir de la comparación de los valores obtenidos por las tres técnicas se establecieron unos valores de corte para el ELISA. Según estos puntos de corte, sueros con valores de D.O. superiores a 0,7 serían positivos por las tres técnicas. Mientras que sueros con valores de D.O. entre 0,7 y 0,3 serían negativos por *western-blot*, pero podrían ser positivos o negativos por neutralización. Esta diferencia entre los resultados de ELISA y los de neutralización en sueros con baja reactividad por ELISA se ha observado también en estudios longitudinales con el virus del SARS en los que se comparaba el título de anticuerpos frente a un antígeno interno de la partícula viral, en concreto la proteína de la nucleocápsida y el título de anticuerpos neutralizantes. Según este estudio, los anticuerpos neutralizantes, si bien siguen un perfil parecido a otras poblaciones de anticuerpos, permanecían detectables en el suero durante más tiempo (Liu y col., 2006). Por último, sueros con valores de D.O. inferiores a 0,3 se considerarían negativos pues con estos valores únicamente encontramos los sueros de cerdo libres de patógenos. Estos puntos de corte se establecieron en base a un número reducido de sueros, por lo que deberán ser revisados conforme se analicen más sueros.

Como se comentó anteriormente, la neutralización de la infectividad viral es una técnica de difícil aplicación en un laboratorio de diagnóstico. Otro ensayo de diagnóstico clásico como la inhibición de la hemoaglutinación se ha utilizado anteriormente para detectar anticuerpos frente a BEV en sueros de caballos (Zanoni y col., 1986) y frente a BToV en sueros de terneras (Hoet y col., 2003). Sin embargo, en nuestro caso, al utilizar BEV como agente de hemoaglutinación para la detección de anticuerpos frente a torovirus porcino en sueros de cerdo, no obtuvimos suficiente sensibilidad. Por lo tanto, es necesario seguir trabajando en el desarrollo de nuevas herramientas de diagnóstico basadas en otros antígenos del virus, que nos permitan obtener información acerca de la presencia de anticuerpos para complementar la información que se obtiene mediante el ensayo de ELISA frente a la proteína N. En este sentido, los sueros de cerdo mostraron una reactividad pobre frente a la proteína HE tanto por ELISA como por *western-blot*, por lo que su utilidad para contrastar un valor de ELISA frente a la proteína N es muy reducida. Esta baja reactividad frente a la proteína HE puede deberse a la variabilidad antigénica de la proteína y/o a las cadenas de glicosilación, que podrían estar dificultando la interacción de los anticuerpos con la proteína. La proteína M, que también hemos expresado y purificado mediante el sistema de baculovirus, es una proteína de membrana muy poco antigénica, que ni siquiera fue reconocida por el suero de cerdo anti-BRES. En el futuro se abordará la expresión de formas modificadas de la proteína HE, así como, la expresión de la proteína S, que permitirán desarrollar sistemas de diagnóstico frente a una proteína implicada en el proceso de infección del virus.

A pesar de que los primeros análisis se llevaron a cabo con un número reducido de sueros, es interesante observar las diferencias entre los sueros de las granjas de Aragón, Navarra y Galicia. En las granjas de Navarra y Aragón los sueros corresponden a cerdos adultos y todos fueron positivos por los tres métodos descritos. Además, se observa como en la granja de Aragón donde un mes antes habíamos detectado la presencia de PToV mediante snRT-PCR (PToV-ZAR2) los títulos de anticuerpos tanto por ELISA como por neutralización fueron elevados, mientras que en la granja de Navarra donde en el momento de la recogida de muestras no se observaba ninguna sintomatología en los cerdos, los títulos de anticuerpos fueron bajos. Los datos obtenidos con los 30 sueros de las tres granjas de ganado porcino de Aragón y Navarra junto con los 595 sueros de la seroteca cedida por los Laboratorios HIPRA pertenecientes a diferentes granjas de distintas regiones ganaderas de España, demuestran la elevada prevalencia de anticuerpos frente a PToV en los sueros de cerdos adultos. De los 625 sueros de cerdos adultos analizados 622 (100%) fueron positivos con valores de D.O. superiores a 0,7, mientras que sólo se encontraron 3 sueros dudosos con valores de D.O. entre 0,3 y 0,7 (0.5%) y todos ellos fueron positivos por neutralización. Los valores de prevalencia de anticuerpos frente a PToV en cerdos adultos, son superiores a los observados en un estudio anterior realizado en Bélgica (81%) utilizando como método de diagnóstico el ensayo de neutralización de la infectividad de BEV (Kroneman y col., 1998), pero similares a los descritos para BToV (Koopmans y col., 1989). En este último estudio, se analizaron 2029 sueros de vacas procedentes de distintas granjas de Alemania mediante ELISA frente a BToV purificado y se observó una prevalencia frente a torovirus del 94%. Sólo los sueros de terneras spf y de toros de un centro de inseminación artificial fueron negativos.

El estudio longitudinal realizado, en el que se analizó la evolución del título de anticuerpos frente a PToV en 160 lechones de cuatro granjas distintas, demuestra que la infección por torovirus ocurre en las primeras semanas de vida de los lechones, principalmente entre las semanas 3 y 7, aunque puede darse también semanas más tarde. Esto sugiere que el virus es endémico en las explotaciones de ganado porcino. Los lechones son destetados en la tercera semana de vida, momento en el que el 60% de los lechones ha perdido la protección inmunológica de la madre o sus títulos de anticuerpos eran bajos. También en este momento los lechones son reagrupados con otros lechones de su edad. En la semana 7, el 80% de los lechones presentaron anticuerpos frente al virus. La rápida aparición de anticuerpos tras el destete sugiere que es, en esta ventana de tiempo, cuando los lechones son más susceptibles a la infección. Por último, en la semana 15 el 99% de los lechones presentan anticuerpos contra PToV, lo que correlaciona con los resultados obtenidos con los sueros de cerdos adultos de la

seroteca de HIPRA y de las muestras procedentes de las granjas de Navarra y Aragón. En nuestro estudio longitudinal ni las madres ni los lechones presentaron síntomas de gastroenteritis durante el periodo que duró el ensayo, indicando que el curso de la infección en estas granjas era asintomático.

Nuestros resultados, son similares a los que se han obtenidos en un estudio longitudinal acerca de PToV (Kroneman y col., 1998) en el que se analizaron los sueros de 13 lechones entre las semanas 2 y 11 mediante neutralización de BEV, así como, en otro estudio acerca de BToV (Van Kruiningen y col., 1992) en el que se analizaron los sueros de 149 vacas de distintas edades mediante ELISA utilizando BToV como antígeno. Según el modelo propuesto de dispersión de BToV (Koopmans y col., 1989; Van Kruiningen y col., 1992; Hoet and Saif 2004) los anticuerpos maternos sólo protegen parcialmente a las terneras frente al virus, por lo que estas terneras se infectan a los pocos meses de nacer liberando virus por las heces a niveles muy bajos y sin síntomas claros de infección (infecciones subclínicas). De igual forma sucedería en algunos animales adultos que actuarían como reservorios del virus. Nuestros resultados sugieren que la dispersión de PToV en las explotaciones porcinas ocurre de una forma similar a la descrita para BToV.

El hecho de que la mayoría de las infecciones de PToV cursen de forma asintomática hace difícil establecer una relación directa entre la presencia de PToV y la aparición de diarrea en los lechones (Koopmans y col., 1991). Además, al no haberse descrito una infección experimental por PToV en cerdos de laboratorio, la relación directa entre PToV y la diarrea severa aún está por demostrar. No ocurre así en el caso de BToV, ya que la infección experimental con BToV de terneras ya ha sido descrita (Woode y col., 1982) y se utiliza como método de obtención de antígenos para los ensayos de diagnóstico.

3. COMPARACIÓN ENTRE LOS MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR Y SEROLÓGICO PARA PTOV

Los resultados obtenidos mediante RT-PCR en muestras de de heces de lechones con gastroenteritis en este estudio y en otros (Kroneman y col., 1998; Matiz y col., 2002) sugieren que la incidencia de torovirus porcino es muy baja, entorno al 4-5%. Estos resultados son muy parecidos a los obtenidos para BToV (Brown y col., 1990; Koopmans y col., 1991; Matiz y col., 2002; Hoet y col., 2003; Haschek y col., 2006; Ito y col., 2007; Park y col., 2007), aunque en algunos estudios, también sobre BToV, se ha llegado a una prevalencia del 25-30% (Hoet y col., 2002; Matiz y col., 2002; Hoet y col., 2003). Esta baja incidencia de ambos virus en muestras de heces contrasta con la elevada prevalencia de anticuerpos contra estos virus, que se observa en

poblaciones de ganado bovino (Koopmans y col., 1989) y de ganado porcino (Kroneman y col., 1998). Esta discrepancia entre la serología y el diagnóstico molecular de los torovirus es debida a varios factores. El primero de estos factores sería la corta ventana de tiempo en la que PToV se libera en las heces (1-9 días tras la infección) y a una falta de síntomas claros de infección (infecciones subclínicas) en la mayoría de los casos (Kroneman y col., 1998). Un segundo factor sería la presencia en las heces de sustancias inhibitoras de la reacción de las polimerasas descritas tanto en trabajos relacionados con BToV (Hoet y col., 2003) como en otros trabajos de diagnóstico molecular en heces (Shieh y col., 1997). La naturaleza de estas sustancias inhibitoras no está muy clara. Se ha descrito la presencia de nucleasas y proteasas de origen bacteriano, así como, inhibidores de polimerasas como los ácidos húmicos, los ácidos biliares o los iones calcio (Wilson 1997). Para la eliminación de los inhibidores de polimerasas se han descrito numerosos métodos físico-químicos, pero estos procedimientos son difícilmente aplicables al análisis de un gran número de muestras. El método más utilizado para la obtención de ácidos nucleicos a partir de muestras biológicas es la unión de éstos a matrices de sílice. Este sistema permite la extracción selectiva de los ácidos nucleicos a partir de un pequeño volumen de muestra y es fácilmente aplicable al análisis de muchas muestras. Sin embargo, estos métodos no permiten eliminar todos los inhibidores de polimerasas (Arnal y col., 1999). La captura del virus o de su material genético mediante la utilización de anticuerpos o sondas de DNA unidos a una matriz, como las esferas magnéticas, son una buena alternativa para la eliminación de estos contaminantes, ya que permiten concentrar el material genético y son fácilmente aplicables al análisis de un gran número de muestras, a pesar de que el uso de esta tecnología puede aumentar considerablemente el coste del método de diagnóstico (Jothikumar y col., 1998; Gilpatrick y col., 2000). Por ello, un objetivo futuro del laboratorio es la exploración de esta estrategia para mejorar la sensibilidad de nuestro sistema de diagnóstico por RT-PCR. En este sentido, los anticuerpos generados frente a la proteína HE de PToV (anti-HEpept) y frente a la proteína N (anti-PToV-N) podrían ser utilizados para capturar las partículas virales o nucleocápsidas en las muestras de heces, como paso previo a la extracción del RNA.

4. EVOLUCIÓN FILOGENÉTICA DE LOS TOROVIRUS

Los estudios filogenéticos sobre la evolución de los torovirus se han visto restringidos a la utilización de las secuencias de un número reducido de aislados de campo tanto de PToV, como de BToV y HToV. Hasta el momento, sólo se han descrito 5 aislados de PToV, todos ellos detectados en Europa (Kroneman y col., 1998; Matiz y col., 2002; Smits y col., 2003) y de los que se dispone de las secuencias completas de sus cuatro proteínas estructurales S, M, HE y N. Por

su parte, para BToV se dispone de la secuencia de las proteínas estructurales de 7 aislados europeos (Smits y col., 2003), de los dos aislados de EEUU, BRV1 (Woode y col., 1982) y BRV2 (Woode y col., 1985), así como, secuencias parciales de los nuevos aislados encontrados recientemente en Japón (Ito y col., 2007) y Corea (Park y col., 2007). Además recientemente se ha publicado la secuencia completa de BRV (Draker y col., 2005; Park y col., 2007). En cuanto a BEV, se ha obtenido la secuencia completa de su genoma, aunque hasta el momento solo se han publicado parte de la ORF1a, la ORF 1b y los genes completos de sus proteínas estructurales (Snijder y col., 1990; Smits y col., 2003).

Por ello, a partir de la amplificación de los genes estructurales de PToV-BRES2 quisimos analizar las relaciones filogenéticas entre nuestro aislado (PToV-BRES2) y el resto de aislados porcinos ya descritos. La secuenciación y el análisis filogenético del aislado reveló que a nivel de la proteína HE, este aislado está relacionado con la cepa P4 de PToV. El aislado P4 de PToV es el único representante del linaje de PToV denominado tipo P4 y se considera un ancestro a partir del cual se habrían originado, mediante recombinación con un torovirus aún no identificado, los aislados P9, P10, P78 y P-Markelo que se agrupan como un segundo linaje denominado tipo Markelo. Además, dado que no se había vuelto a detectar otro aislado con una secuencia similar, el linaje tipo P4 se había considerado extinguido (Smits y col., 2003). Por lo tanto, el hallazgo de la cepa PToV-BRES2, así como, su relación con la cepa P4, abre la posibilidad a la coexistencia de ambos linajes, tal y como ocurre con los linajes tipo B6 y tipo-B150 de BToV. Según se ha descrito anteriormente, los linajes tipo B6 y tipo B150 de BToV son antigénicamente distintos (Smits y col., 2005) en lo que respecta a la proteína HE, por lo que en el futuro desarrollo de herramientas diagnósticas basadas en la utilización de la proteína HE, habrá que tener en cuenta la posibilidad de que también en torovirus porcino existan diferencias antigénicas entre los dos linajes de la proteína HE, si bien esto aún no se ha analizado.

5. ANÁLISIS DE LA PROTEÍNA HE DE PTOV-BRES2

La proteína HE de PToV-BRES2 expresada en células de insecto y de mamífero es una proteína glicosilada de 65 kDa. Además, la proteína HE expresada en células de mamífero se localizó en el citoplasma, en la membrana nuclear y en la membrana plasmática. Nuestros resultados de los ensayos de hemoadsorción demuestran que la proteína HE presente en la membrana de la célula es funcional. Estudios previos acerca de la proteína HE de BRV, ya la describían como una proteína de membrana tipo I que en expresiones transitorias se localizaba en la membrana plasmática y nuclear (Cornelissen y col., 1997). Según estas observaciones, la

ruta biosintética de la proteína HE de los torovirus tendría paralelismos con la de la proteína HE de BCoV, la cuál es sintetizada y modificada rápidamente en el retículo endoplasmático y a continuación es transportada al compartimiento intermedio donde es retenida, y donde tiene lugar el ensamblaje de las partículas virales, si bien una parte de la proteína escapa hacia la membrana (Nguyen and Hogue 1997).

La presencia de la proteína HE en la membrana de las células infectadas, así como en la partícula viral, constituye una diana para el sistema inmune por lo que la proteína HE podría ser un candidato para el desarrollo de vacunas frente a torovirus (Kienzle y col., 1990). El virus recombinante de vaccinia rVV-HE, podría ser utilizado como una posible herramienta para el desarrollo de una vacuna frente a PToV. El desarrollo de vacunas basadas en recombinantes del virus vaccinia es un campo muy explorado, incluso para inducir inmunidad en mucosas (Gherardi and Esteban 2005).

En este trabajo, hemos demostrado que la proteína HE de PToV, expresada en células de mamífero infectadas con el rVV-HE, tiene con actividad acetilesterasa capaz de degradar los sustratos sintéticos α -naftil acetato y p-nitrofenil acetato. También hemos demostrado que la proteína HE expresada en la membrana plasmática de las células infectadas con rVV-HE es capaz de aglutinar eritrocitos de ratón y de rata a 4°C, pero que esta unión es reversible a 37°C, debido a su actividad acetilesterasa. En trabajos previos, se ha descrito la proteína HE de los torovirus como una proteína destructora de receptores (RDE) por su actividad acetilesterasa. Esta característica también se ha encontrado en proteínas de otros virus como los coronavirus de tipo 2a y la proteína HEF de influenza C (Cornelissen y col., 1997; Duckmanton y col., 1999; Smits y col., 2005). Sin embargo no se había analizado la capacidad de aglutinación de la proteína HE de torovirus aislada de la partícula viral. En ensayos previos y también en este trabajo se ha observado que BEV es capaz de aglutinar eritrocitos de conejo y de humano del grupo O y esto se debe únicamente a la capacidad aglutinante de la proteína S (Zanoni y col., 1986) ya que BEV carece de proteína HE en su membrana. Por su parte, BToV es capaz de aglutinar eritrocitos de rata y ratón, pero permanece unido a los eritrocitos de rata incluso a 37°C, lo que indica que en el caso de BToV es la proteína S la que interacciona con los eritrocitos de rata (Woode y col., 1982). En este sentido, dado que la unión a los eritrocitos es un reflejo de la unión a un receptor celular, sería interesante establecer la función de la proteína HE en este proceso y su relación con la proteína S. En los torovirus, la proteína encargada de unirse a los receptores celulares y de iniciar la infección es la proteína S, como demuestra el hecho de que BEV, que carece de una proteína HE, sea capaz de infectar células *in vitro*. Por su parte, la función más aceptada de la proteína HE es la de degradar los ácidos siálicos libres, por ejemplo

en la mucosidad del tracto intestinal permitiendo que la partícula viral alcance el epitelio favoreciendo así la infección. Sin embargo, en los coronavirus HCoVOC43 y BCoV, se ha descrito que la función de la proteína HE podría ser la de unirse a receptores celulares degradándolos, y sería, por lo tanto, una función similar a la de la proteína neuroaminidasa de influenza A y B (de Groot 2006).

Para tratar de esclarecer el papel de la proteína HE de PToV y su relación con la proteína S, uno de los futuros trabajos del laboratorio será el clonaje y la expresión de la proteína S de PToV, ya que entonces se dispondría de un sistema para expresar ambas proteína S y HE de PToV y se podrían analizar las características de cada una de ellas de forma independiente o conjunta.

En este trabajo también hemos descrito la capacidad de la proteína HE de PToV-BRES2 de formar estructuras diméricas y multiméricas mediante puentes disulfuro tanto en células de mamífero como en células de insecto. Estas formas estarían presentes en la membrana plasmática como indican los experimentos de entrecruzamiento químico en membrana. Nuestros resultados contrastan con los publicados acerca de la proteína HE de BRV, según los cuales la proteína HE no forma dímeros ni en células que expresan de forma transitoria la proteína, ni en la partícula viral (Cornelissen y col., 1997). Sin embargo, por comparación con las proteínas HE del coronavirus de la hepatitis de ratón (MHV) que forma dímeros unidos por puentes disulfuro y con la proteína HEF de influenza C, que forma trímeros, se asume que la proteína HE de torovirus debe formar oligómeros y que éstos deben estar presentes en la partícula viral (de Groot 2006), por lo que se ha sugerido que la proteína HE de BRV debe formar oligómeros mediante uniones no covalentes, de forma similar a la hemaglutinina HEF de influenza C (Deregt y col., 1987).

A partir de la comparación de las secuencias de los ectodominios de las proteínas HE de influenza C, de coronavirus y de torovirus se ha propuesto un modelo estructural para la proteína HE de los torovirus. La proteína HE tiene 17 residuos de cisteína en el ectodominio, 16 de los cuales estarían formando puentes disulfuro intramoleculares y sólo la cisteína 18, exclusiva de los torovirus, estaría desemparejada. No obstante, dada la cercanía de esta cisteína al dominio catalítico, resulta improbable la formación de un puente disulfuro intermolecular en este residuo (de Groot 2006). No obstante, este modelo no contempla los 37 últimos aminoácidos del extremo C-terminal donde se encuentra otra cisterna, la cisteína 406 que está igualmente conservada en todos los torovirus. En el aislado BRV, esta cisteína es el último aminoácido de la proteína, mientras que en el resto de aislados bovinos modernos y en todos los aislados de PToV estaría formando parte de una cola citoplasmática en la que la cisterna 406

estaría seguida por cuatro aminoácidos 407-LSSY-409 y por lo que sería un candidato a formar puentes disulfuro intermoleculares (Figura 1).

	370	380	390	400
BRV- HE	SGNENIDVIS	SSYFVATWVL	LVVVVILIFV	IISFFC*----
BToV-HE B145	SSDENVDVTS	SAYFVATWVL	LVLV IIL IF I	LISF -CLSSY*
BToV-HE B1314	SSDENVDVTS	SAYFVATWVL	LVLV IIL IF I	LISF -CLSSY*
BToV-HE B156	SSDENVDVTS	SAYFVATWVL	LVLV IIL IF I	LISF -CLSSY*
BToV-HE B6	SSDENVDVTF	SAYFVATWVL	LVLV IIL IF I	LISF -CLSSY*
BToV-HE B150	SSDENVDVTS	SAYFVATWVL	LVLV IIL IF I	LISF -CLSSY*
BToV-HE B155	SSDENVDVIS	SAYFVATWVL	LVLV IIL IF I	LISF -CLSSY*
PToV-HE Markelo	SSDENVDVTS	SAYFVATWVL	LVLV IILVF I	LISF -CLSSY*
PToV-HE P78	SSDENVDVTS	SAYFVATWVL	LVLV IIL IF I	LISF -CLSSY*
PToV-HE P10	SSDENVDVTS	SAYFVATWVL	LVLV IIL IF I	LISF -CLSSY*
PToV-HE P9	SSDENVDVTS	SAYFVATWVL	LVLV IILVF I	LISF -CLSSY*
PToV-HE BRES2	SGDENVDVTS	SAYFVATWVL	LVLV IIL IF I	LISF -CLSSY*
PToV-HE P4	SSDENVDVTS	SAYFVATWVL	LVLV IIL IF I	LISF -CLSSY*

Figura 1. Alineamiento de la secuencia del extremo C-terminal de la proteína HE del aislado BRV (verde), PToV-BRES2 (azul) y el resto de aislados descritos para BToV y PToV. En rojo se muestra el residuo Cisteína₄₀₆.

La región 3' del gen HE de BRV fue sustituida por la región correspondiente de un aislado de PToV durante uno de los fenómenos de recombinación intertípica acaecidos en el gen HE durante la evolución de los torovirus (ver introducción). Este cambio se ha mantenido en los aislados modernos hallados en Europa (Smits y col., 2003; Haschek y col., 2006) y podría haber provocado un cambio en la estructura del extremo N-terminal de la proteína permitiendo la formación de dímeros por puentes disulfuro, de forma similar a como ocurre en coronavirus. Nuestros intentos para determinar mediante espectrometría de masas las cisteínas implicadas tanto en los puentes disulfuro intramoleculares como intermoleculares, no aportaron resultados concluyentes, ya que al tratar las formas reducidas y no reducidas de la proteína con distintas proteasas, la mayoría de los péptidos que se obtenían eran de un peso molecular demasiado alto para ser resueltos por esta técnica. Por lo tanto, para determinar que cisteínas están implicadas en la formación de dímeros será necesario generar y analizar mutantes de delección de la proteína en los que se suprima, por ejemplo, la cola citoplasmática, así como mutantes puntuales en los que se sustituyan diferentes residuos de cisteínas.

6. ADAPTACIÓN AL CULTIVO *IN VITRO* DE PTOV.

Como se ha comentado anteriormente el principal escollo para el avance en el conocimiento del torovirus porcino es la falta de un sistema celular donde poder crecer el virus *in vitro*. En trabajos previos se han descrito los intentos llevados a cabo para adaptar BToV al cultivo *in vitro*

en líneas establecidas, así como en embriones de pollo o cultivos de órganos (Hoet and Saif 2004), pero ninguno de estos intentos dio resultados positivos.

Según los estudios acerca de la infección experimental con BToV en terneras, los torovirus infectan las células del epitelio intestinal del yeyuno-medio, ileon e intestino grueso, tanto de la superficie del epitelio intestinal como de las criptas intestinales (Fagerland y col., 1986).

En la literatura se han descrito diversos métodos para la obtención de cultivos de criptas intestinales de bovino (Föllmann y col., 2000; Leschelle y col., 2002; Rusu y col., 2005) y también de porcino (Leschelle y col., 2002), si bien las células obtenidas a partir de explantes de intestinos de cerdos perdían viabilidad a las pocas horas, debido al parecer a la forma de sacrificar el animal en los mataderos de donde se obtenían los tejidos (Föllmann y col., 2000). En colaboración con el personal del animalario del Centro Nacional de investigación en sanidad animal- Instituto nacional de investigaciones agrarias (CISA-INIA) y siguiendo el protocolo descrito por Föllman (Föllmann y col., 2000), obtuvimos un cultivo primario de criptas intestinales de cerdo a partir de tres tramos de intestino: yeyuno, ileon y colon. A pesar de que no se profundizó en la caracterización de las células, la morfología de las criptas tras el aislamiento, así como el crecimiento radial de las células a partir de las criptas y el aspecto pavimentado de las monocapas son características muy similares a las descritas previamente para estos cultivos (Föllmann y col., 2000; Leschelle y col., 2002; Rusu y col., 2005). Los cultivos de criptas obtenidas tanto de yeyuno, ileon y colon pudieron ser subcultivados durante 6-7 pases, aunque la velocidad de crecimiento disminuyó gradualmente.

Una vez obtenidos los cultivos de los explantes de criptas intestinales, infectamos células de cada uno de los tramos de intestino, yeyuno, ileon y colon con una preparación de virus obtenida mediante la suspensión de las heces de cerdo P-BRES2 en PBS. A pesar de que a las 24 horas tras la “infección”, se observó un efecto citopático claro en las células procedentes de los tres tramos del intestino este no se reprodujo en posteriores infecciones ni se detectó la presencia de RNA viral por RT-PCR en los sobrenadantes ni en las células infectadas.

La adaptación de un virus al cultivo *in vitro*, cuando éste no crece en líneas celulares establecidas, es un proceso largo y de futuro incierto hasta encontrar una línea susceptible de ser infectada y las condiciones óptimas de la infección. Como factores que pueden influir en la susceptibilidad de una célula a ser infectada, se encuentran el pH del medio de infección y la presencia de algunos compuestos, como por ejemplo la tripsina, que se ha visto que potencia la infectividad del virus BEV (Hoet and Saif 2004) *in vitro*, sin embargo en nuestro sistema la adición de tripsina al medio de infección con PToV no aportó ninguna mejora. En otros trabajos se ha descrito la necesidad de un porcentaje de sales biliares o de contenido intestinal en el

medio de infección como en el caso del calicivirus entérico porcino (PEC) para infectar células primarias de riñón (PPK) (Flynn and Saif 1988; Guo y col., 2001; Chang y col., 2002; Chang y col., 2004). En futuros trabajos del laboratorio se intentará de nuevo adaptar el virus probando entre otras cosas la adición de un porcentaje de contenido intestinal o de sales biliares al medio de cultivo.

Finalmente, las herramientas para el diagnóstico molecular y serológico de PToV desarrolladas en este trabajo, se van utilizar para un estudio epidemiológico en el territorio español, que incluirá el análisis tanto de heces como de sueros. Este trabajo se llevará a cabo en colaboración con otros laboratorios españoles en el marco del proyecto PORCIVIR financiado por el programa CONSOLIDER. Los virus recombinantes, así como los sueros generados contra las proteínas N y HE, nos servirán para llevar a cabo otros estudios de biología molecular, que nos permitirán conocer en mayor profundidad un virus poco estudiado pero que sin embargo está muy presente en las explotaciones ganaderas. Asimismo, estos virus recombinantes podrían utilizarse para obtener vacunas basadas en una o varias de las proteínas del virus.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. Se han desarrollado dos sistemas de diagnóstico para la detección de PToV en muestras de heces de cerdo, mediante RT-PCR y RT-PCR semianidada.
2. El método de diagnóstico por RT-PCR permitió la detección de un nuevo aislado de PToV (PToV-BRES2) y de un aislado de BToV (BToV-BRES2) en dos muestras de heces procedentes de Italia. El método de amplificación por RT-PCR semianidada, permitió a su vez, la detección del primer aislado de PToV (PToV-ZAR2) en España.
3. La secuenciación del gen HE del aislado PToV-BRES2 reveló que este aislado pertenece al linaje tipo P4 de PToV, lo que abre la posibilidad de la coexistencia de los dos linajes descritos para la proteína HE de PToV, al igual que sucede con la proteína HE de BToV.
4. La proteína HE de PToV-BRES2 es una glicoproteína de membrana que actúa como una enzima destructora de receptores con capacidad para unir y degradar los ácidos siálicos presentes en la superficie de los eritrocitos de rata y ratón, pero no los de conejo.
5. La proteína HE de PToV-BRES2 forma dímeros unidos por puentes disulfuro cuando se expresa tanto en células de mamífero como en células de insecto.
6. Se ha desarrollado un método de ELISA para la detección de anticuerpos frente a torovirus en muestras de suero de cerdo. El ensayo está basado en la utilización de la proteína N de PToV purificada como antígeno. Esta herramienta pueden ser utilizada para llevar a cabo estudios epidemiológicos sobre PToV.
7. El análisis por ELISA de los sueros procedentes de diferentes granjas españolas distribuidas por distintas regiones geográficas reveló una elevada prevalencia de anticuerpos frente a PToV en el ganado porcino en España.
8. El estudio longitudinal en cuatro granjas de Cataluña indica que la infección por torovirus en lechones ocurre tras el destete, mayoritariamente entre las semanas 3 y 7.
9. El aislamiento de criptas intestinales de cerdo permitió obtener cultivos primarios de células epiteliales de intestino de cerdo. Estos cultivos pudieron ser subcultivados durante varias semanas.
10. Los intentos para adaptar PToV al crecimiento en cultivos *in vitro* en los cultivos primarios de células intestinales de cerdo no han prosperado hasta ahora.

BIBLIOGRAFÍA

- (1994). "Revision of the taxonomy of the Coronavirus, Torovirus and Arterivirus genera." Arch Virol **135**(1-2): 227-37.
- Altmann, F., E. Staudacher, I. B. Wilson y L. Marz (1999). "Insect cells as hosts for the expression of recombinant glycoproteins." Glycoconj J **16**(2): 109-23.
- Arnal, C., V. Ferre-Aubineau, B. Besse, B. Mignotte, L. Schwartzbrod y S. Billaudel (1999). "Comparison of seven RNA extraction methods on stool and shellfish samples prior to hepatitis A virus amplification." J Virol Methods **77**(1): 17-26.
- Beards, G. M., D. W. Brown, J. Green y T. H. Flewett (1986). "Preliminary characterisation of torovirus-like particles of humans: comparison with Berne virus of horses and Breda virus of calves." J Med Virol **20**(1): 67-78.
- Bogdanova, V. S., V. V. Tsibezov, V. V. Grabovetskii, O. V. Eliseeva, T. V. Grebennikova, O. A. Verkhovskii, A. D. Zabereshchnyi y T. I. Aliper (2007). "[Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to porcine reproductive and respiratory syndrome virus, by using recombinant nucleocapsid protein N]." Vopr Virusol **52**(2): 45-9.
- Brown, D., J. H. Morgan y J. C. Bridger (1990). "Survey for Breda virus in neonatal calf diarrhoea." Vet Rec **126**(14): 337.
- Brown, D. W., G. M. Beards y T. H. Flewett (1987). "Detection of Breda virus antigen and antibody in humans and animals by enzyme immunoassay." J Clin Microbiol **25**(4): 637-40.
- Brown, D. W., R. Selvakumar, D. J. Daniel y V. I. Mathan (1988). "Prevalence of neutralising antibodies to Berne virus in animals and humans in Vellore, South India. Brief report." Arch Virol **98**(3-4): 267-9.
- Cavanagh, D., D. A. Brian, M. A. Brinton, L. Enjuanes, K. V. Holmes, M. C. Horzinek, M. M. Lai, H. Laude, P. G. Plagemann, S. G. Siddell y et al. (1993). "The Coronaviridae now comprises two genera, coronavirus and torovirus: report of the Coronaviridae Study Group." Adv Exp Med Biol **342**: 255-7.
- Cavanagh, D. y M. C. Horzinek (1993). "Genus Torovirus assigned to the Coronaviridae." Arch Virol **128**(3-4): 395-6.
- Cornelissen, L. A., C. M. Wierda, F. J. van der Meer, A. A. Herrewegh, M. C. Horzinek, H. F. Egberink y R. J. de Groot (1997). "Hemagglutinin-esterase, a novel structural protein of torovirus." J Virol **71**(7): 5277-86.
- Cowley, J. A., C. M. Dimmock y P. J. Walker (2002). "Gill-associated nidovirus of *Penaeus monodon* prawns transcribes 3'-coterminal subgenomic mRNAs that do not possess 5'-leader sequences." J Gen Virol **83**(Pt 4): 927-35.
- Cowley, J. A. y P. J. Walker (2002). "The complete genome sequence of gill-associated virus of *Penaeus monodon* prawns indicates a gene organisation unique among nidoviruses." Arch Virol **147**(10): 1977-87.
- Chang, K. O., Y. Kim, K. Y. Green y L. J. Saif (2002). "Cell-culture propagation of porcine enteric calicivirus mediated by intestinal contents is dependent on the cyclic AMP signaling pathway." Virology **304**(2): 302-10.
- Chang, K. O., S. V. Sosnovtsev, G. Belliot, Y. Kim, L. J. Saif y K. Y. Green (2004). "Bile acids are essential for porcine enteric calicivirus replication in association with down-regulation of signal transducer and activator of transcription 1." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(23): 8733-8.
- Chirnside, E. D., P. M. Francis, A. A. de Vries, R. Sinclair y J. A. Mumford (1995). "Development and evaluation of an ELISA using recombinant fusion protein to detect the presence of host antibody to equine arteritis virus." J Virol Methods **54**(1): 1-13.
- de Groot, R. J. (2006). "Structure, function and evolution of the hemagglutinin-esterase proteins of corona- and toroviruses." Glycoconj J **23**(1-2): 59-72.

- Den Boon, J. A., E. J. Snijder, J. K. Locker, M. C. Horzinek y P. J. Rottier (1991). "Another triple-spanning envelope protein among intracellularly budding RNA viruses: the torovirus E protein." *Virology* **182**(2): 655-63.
- Denac, H., C. Moser, J. D. Tratschin y M. A. Hofmann (1997). "An indirect ELISA for the detection of antibodies against porcine reproductive and respiratory syndrome virus using recombinant nucleocapsid protein as antigen." *J Virol Methods* **65**(2): 169-81.
- Deregt, D., M. Sabara y L. A. Babiuk (1987). "Structural proteins of bovine coronavirus and their intracellular processing." *J Gen Virol* **68** (Pt 11): 2863-77.
- Draker, R., R. L. Roper, M. Petric y R. Tellier (2005). "The complete sequence of the bovine torovirus genome." *Virus Res.*
- Duckmanton, L., S. Carman, E. Nagy y M. Petric (1998). "Detection of bovine torovirus in fecal specimens of calves with diarrhea from Ontario farms." *J Clin Microbiol* **36**(5): 1266-70.
- Duckmanton, L., B. Luan, J. Devenish, R. Tellier y M. Petric (1997). "Characterization of torovirus from human fecal specimens." *Virology* **239**(1): 158-68.
- Duckmanton, L., R. Tellier, C. Richardson y M. Petric (1999). "The novel hemagglutinin-esterase genes of human torovirus and Breda virus." *Virus Res* **64**(2): 137-49.
- Durham, P. J., L. E. Hassard, G. R. Norman y R. L. Yemen (1989). "Viruses and virus-like particles detected during examination of feces from calves and piglets with diarrhea." *Can Vet J* **30**(11): 876-881.
- Escribano, J. M., M. J. Pastor y J. M. Sanchez-Vizcaino (1989). "Antibodies to bovine serum albumin in swine sera: implications for false-positive reactions in the serodiagnosis of African swine fever." *Am J Vet Res* **50**(7): 1118-22.
- Fagerland, J. A., J. F. Pohlenz y G. N. Woode (1986). "A morphological study of the replication of Breda virus (proposed family Toroviridae) in bovine intestinal cells." *J Gen Virol* **67** (Pt 7): 1293-304.
- Flynn, W. T. y L. J. Saif (1988). "Serial propagation of porcine enteric calicivirus-like virus in primary porcine kidney cell cultures." *J Clin Microbiol* **26**(2): 206-12.
- Follmann, W., S. Weber y S. Birkner (2000). "Primary cell cultures of bovine colon epithelium: isolation and cell culture of colonocytes." *Toxicol In Vitro* **14**(5): 435-45.
- Frazatti-Gallina, N. M., R. M. Mourao-Fuches, R. L. Paoli, M. L. Silva, C. Miyaki, E. J. Valentini, I. Raw y H. G. Higashi (2004). "Vero-cell rabies vaccine produced using serum-free medium." *Vaccine* **23**(4): 511-7.
- Gallardo, C., E. Blanco, J. M. Rodriguez, A. L. Carrascosa y J. M. Sanchez-Vizcaino (2006). "Antigenic properties and diagnostic potential of African swine fever virus protein pp62 expressed in insect cells." *J Clin Microbiol* **44**(3): 950-6.
- Garzon, A., A. M. Maestre, J. Pignatelli, M. T. Rejas y D. Rodriguez (2006). "New insights on the structure and morphogenesis of Berne virus." *Adv Exp Med Biol* **581**: 175-80.
- Garzón, A., A. M. Maestre, J. Pignatelli, M. T. Rejas y D. Rodriguez (2006). "New insights on the structure and morphogenesis of Berne virus." *Adv Exp Med Biol* **581**: 175-80.
- Gernot, T. H. E. (2000). "Quantitative screening method for hydrolases in microplates using pH indicators: determination of kinetics parameters by dynamic pH monitoring."
- Gherardi, M. M. y M. Esteban (2005). "Recombinant poxviruses as mucosal vaccine vectors." *J Gen Virol* **86**(Pt 11): 2925-36.
- Gherardi, M. M., J. C. Ramirez, D. Rodriguez, J. R. Rodriguez, G. Sano, F. Zavala y M. Esteban (1999). "IL-12 delivery from recombinant vaccinia virus attenuates the vector and enhances the cellular immune response against HIV-1 Env in a dose-dependent manner." *J Immunol* **162**(11): 6724-33.
- Gilpatrick, S. G., K. J. Schwab, M. K. Estes y R. L. Atmar (2000). "Development of an immunomagnetic capture reverse transcription-PCR assay for the detection of Norwalk virus." *J Virol Methods* **90**(1): 69-78.

- Gonzalez, J. M., P. Gomez-Puertas, D. Cavanagh, A. E. Gorbalenya y L. Enjuanes (2003). "A comparative sequence analysis to revise the current taxonomy of the family Coronaviridae." *Arch Virol* **148**(11): 2207-35.
- Guo, M., J. F. Evermann y L. J. Saif (2001). "Detection and molecular characterization of cultivable caliciviruses from clinically normal mink and enteric caliciviruses associated with diarrhea in mink." *Arch Virol* **146**(3): 479-93.
- Haschek, B., D. Klein, V. Benetka, C. Herrera, I. Sommerfeld-Stur, S. Vilcek, K. Moestl y W. Baumgartner (2006). "Detection of bovine torovirus in neonatal calf diarrhoea in Lower Austria and Styria (Austria)." *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* **53**(4): 160-5.
- Hedges, J. F., U. B. Balasuriya, S. Ahmad, P. J. Timoney, W. H. McCollum, T. Yilma y N. J. MacLachlan (1998). "Detection of antibodies to equine arteritis virus by enzyme linked immunosorbant assays utilizing G(L), M and N proteins expressed from recombinant baculoviruses." *J Virol Methods* **76**(1-2): 127-37.
- Hoet, A. E., K. O. Chang y L. J. Saif (2003). "Comparison of ELISA and RT-PCR versus immune electron microscopy for detection of bovine torovirus (Breda virus) in calf fecal specimens." *J Vet Diagn Invest* **15**(2): 100-6.
- Hoet, A. E., K. O. Cho, K. O. Chang, S. C. Loerch, T. E. Wittum y L. J. Saif (2002). "Enteric and nasal shedding of bovine torovirus (Breda virus) in feedlot cattle." *Am J Vet Res* **63**(3): 342-8.
- Hoet, A. E., P. R. Nielsen, M. Hasoksuz, C. Thomas, T. E. Wittum y L. J. Saif (2003). "Detection of bovine torovirus and other enteric pathogens in feces from diarrhea cases in cattle." *J Vet Diagn Invest* **15**(3): 205-12.
- Hoet, A. E. y L. J. Saif (2004). "Bovine torovirus (Breda virus) revisited." *Anim Health Res Rev* **5**(2): 157-71.
- Hoet, A. E., J. Smiley, C. Thomas, P. R. Nielsen, T. E. Wittum y L. J. Saif (2003). "Association of enteric shedding of bovine torovirus (Breda virus) and other enteropathogens with diarrhea in veal calves." *Am J Vet Res* **64**(4): 485-90.
- Horzinek, M. C., J. Ederveen y M. Weiss (1985). "The nucleocapsid of Berne virus." *J Gen Virol* **66** (Pt 6): 1287-96.
- Horzinek, M. C., T. H. Flewett, L. J. Saif, W. J. Spaan, M. Weiss y G. N. Woode (1987). "A new family of vertebrate viruses: Toroviridae." *Intervirology* **27**(1): 17-24.
- Horzinek, M. C., M. Weiss y J. Ederveen (1987). "Toroviridae: a proposed new family of enveloped RNA viruses." *Ciba Found Symp* **128**: 162-74.
- Hou, X. L., L. Y. Yu y J. Liu (2007). "Development and evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay based on recombinant nucleocapsid protein for detection of porcine epidemic diarrhea (PEDV) antibodies." *Vet Microbiol* **123**(1-3): 86-92.
- Ito, T., N. Okada y S. I. Fukuyama (2007). "Epidemiological analysis of bovine torovirus in Japan." *Virus Res*.
- Jamieson, F. B., E. E. Wang, C. Bain, J. Good, L. Duckmanton y M. Petric (1998). "Human torovirus: a new nosocomial gastrointestinal pathogen." *J Infect Dis* **178**(5): 1263-9.
- Jothikumar, N., D. O. Cliver y T. W. Mariam (1998). "Immunomagnetic capture PCR for rapid concentration and detection of hepatitis A virus from environmental samples." *Appl Environ Microbiol* **64**(2): 504-8.
- Kienzle, T. E., S. Abraham, B. G. Hogue y D. A. Brian (1990). "Structure and expression of the bovine coronavirus hemagglutinin protein." *Adv Exp Med Biol* **276**: 95-102.
- Kienzle, T. E., S. Abraham, B. G. Hogue y D. A. Brian (1990). "Structure and orientation of expressed bovine coronavirus hemagglutinin-esterase protein." *J Virol* **64**(4): 1834-8.
- Koonin, E. V. (1991). "The phylogeny of RNA-dependent RNA polymerases of positive-strand RNA viruses." *J Gen Virol* **72** (Pt 9): 2197-206.
- Koopmans, M., J. Ederveen, G. N. Woode y M. C. Horzinek (1986). "Surface proteins of Breda virus." *Am J Vet Res* **47**(9): 1896-900.

- Koopmans, M., A. Herrewegh y M. C. Horzinek (1991). "Diagnosis of torovirus infection." Lancet **337**(8745): 859.
- Koopmans, M. y M. C. Horzinek (1994). "Toroviruses of animals and humans: a review." Adv Virus Res **43**: 233-73.
- Koopmans, M., M. Petric, R. I. Glass y S. S. Monroe (1993). "Enzyme-linked immunosorbent assay reactivity of torovirus-like particles in fecal specimens from humans with diarrhea." J Clin Microbiol **31**(10): 2738-44.
- Koopmans, M., U. van den Boom, G. Woode y M. C. Horzinek (1989). "Seroepidemiology of Breda virus in cattle using ELISA." Vet Microbiol **19**(3): 233-43.
- Koopmans, M., L. van Wuijckhuise-Sjouke, Y. H. Schukken, H. Cremers y M. C. Horzinek (1991). "Association of diarrhea in cattle with torovirus infections on farms." Am J Vet Res **52**(11): 1769-73.
- Koopmans, M. P., E. S. Goosen, A. A. Lima, I. T. McAuliffe, J. P. Nataro, L. J. Barrett, R. I. Glass y R. L. Guerrant (1997). "Association of torovirus with acute and persistent diarrhea in children." Pediatr Infect Dis J **16**(5): 504-7.
- Krishnan, T. y T. N. Naik (1997). "Electronmicroscopic evidence of torovirus like particles in children with diarrhoea." Indian J Med Res **105**: 108-10.
- Kroneman, A., L. A. Cornelissen, M. C. Horzinek, R. J. de Groot y H. F. Egberink (1998). "Identification and characterization of a porcine torovirus." J Virol **72**(5): 3507-11.
- Lamouliatte, F., P. du Pasquier, F. Rossi, J. Laporte y J. P. Loze (1987). "Studies on bovine Breda virus." Vet Microbiol **15**(4): 261-78.
- Langford, M. P. y G. J. Stanton (1981). "Synergistic antiviral effects of interferon plus antibody against acute hemorrhagic conjunctivitis viruses, herpes virus and adenovirus." Tex Rep Biol Med **41**: 538-42.
- Leschelle, X., V. Robert, S. Delpal, B. Mouille, C. Mayeur, P. Martel y F. Blachier (2002). "Isolation of pig colonic crypts for cytotoxic assay of luminal compounds: effects of hydrogen sulfide, ammonia, and deoxycholic acid." Cell Biol Toxicol **18**(3): 193-203.
- Liebermann, H. (1990). "[New types of virus infections of domestic animals in the German Democratic Republic. 1. Serologic survey studies of the distribution of equine torovirus infections in the GDR]." Arch Exp Veterinarmed **44**(2): 251-3.
- Liebler, E. M., S. Kluver, J. Pohlenz y M. Koopmans (1992). "[The significance of bredavirus as a diarrhea agent in calf herds in Lower Saxony]." Dtsch Tierarztl Wochenschr **99**(5): 195-200.
- Liu, W., A. Fontanet, P. H. Zhang, L. Zhan, Z. T. Xin, L. Baril, F. Tang, H. Lv y W. C. Cao (2006). "Two-year prospective study of the humoral immune response of patients with severe acute respiratory syndrome." J Infect Dis **193**(6): 792-5.
- Maldonado, J., K. Van Reeth, P. Riera, M. Sitja, N. Saubi, E. Espuna y C. Artigas (2006). "Evidence of the concurrent circulation of H1N2, H1N1 and H3N2 influenza A viruses in densely populated pig areas in Spain." Vet J **172**(2): 377-81.
- Matiz, K., S. Kecskemeti, I. Kiss, Z. Adam, J. Tanyi y B. Nagy (2002). "Torovirus detection in faecal specimens of calves and pigs in Hungary: short communication." Acta Vet Hung **50**(3): 293-6.
- Nguyen, V. P. y B. G. Hogue (1997). "Protein interactions during coronavirus assembly." J Virol **71**(12): 9278-84.
- Park, S. I., C. Jeong, H. H. Kim, S. H. Park, S. J. Park, B. H. Hyun, D. K. Yang, S. K. Kim, M. I. Kang y K. O. Cho (2007). "Molecular epidemiology of bovine noroviruses in South Korea." Vet Microbiol.
- Park, S. J., E. H. Oh, S. I. Park, H. H. Kim, Y. J. Jeong, G. K. Lim, B. H. Hyun y K. O. Cho (2007). "Molecular epidemiology of bovine toroviruses circulating in South Korea." Vet Microbiol.

- Pasternak, A. O., W. J. Spaan y E. J. Snijder (2006). "Nidovirus transcription: how to make sense.?" *J Gen Virol* **87**(Pt 6): 1403-21.
- Penrith, M. L. y G. H. Gerdes (1992). "Breda virus-like particles in pigs in South Africa." *J S Afr Vet Assoc* **63**(3): 102.
- Perez, E., A. Kummeling, M. M. Janssen, C. Jimenez, R. Alvarado, M. Caballero, P. Donado y R. H. Dwinger (1998). "Infectious agents associated with diarrhoea of calves in the canton of Tilaran, Costa Rica." *Prev Vet Med* **33**(1-4): 195-205.
- Pohlenz, J. F., N. F. Cheville, G. N. Woode y A. H. Mokresh (1984). "Cellular lesions in intestinal mucosa of gnotobiotic calves experimentally infected with a new unclassified bovine virus (Breda virus)." *Vet Pathol* **21**(4): 407-17.
- Rusu, D., S. Loret, O. Peulen, J. Mainil y G. Dandrifosse (2005). "Immunochemical, biomolecular and biochemical characterization of bovine epithelial intestinal primocultures." *BMC Cell Biol* **6**: 42.
- Saijo, M., T. Ogino, F. Taguchi, S. Fukushi, T. Mizutani, T. Notomi, H. Kanda, H. Minekawa, S. Matsuyama, H. T. Long, N. T. Hanh, I. Kurane, M. Tashiro y S. Morikawa (2005). "Recombinant nucleocapsid protein-based IgG enzyme-linked immunosorbent assay for the serological diagnosis of SARS." *J Virol Methods* **125**(2): 181-6.
- Scott, A. C., M. J. Chaplin, M. J. Stack y L. J. Lund (1987). "Porcine torovirus?" *Vet Rec* **120**(24): 583.
- Schutze, H., R. Ulferts, B. Schelle, S. Bayer, H. Granzow, B. Hoffmann, T. C. Mettenleiter y J. Ziebuhr (2006). "Characterization of White bream virus reveals a novel genetic cluster of nidoviruses." *J Virol* **80**(23): 11598-609.
- Shieh, Y. S., R. S. Baric y M. D. Sobsey (1997). "Detection of low levels of enteric viruses in metropolitan and airplane sewage." *Appl Environ Microbiol* **63**(11): 4401-7.
- Smits, S. L., G. J. Gerwig, A. L. van Vliet, A. Lissenberg, P. Briza, J. P. Kamerling, R. Vlasak y R. J. de Groot (2005). "Nidovirus sialate-O-acetyl esterases: evolution and substrate specificity of coronaviral and toroviral receptor-destroying enzymes." *J Biol Chem* **280**(8): 6933-41.
- Smits, S. L., A. Lavazza, K. Matiz, M. C. Horzinek, M. P. Koopmans y R. J. de Groot (2003). "Phylogenetic and evolutionary relationships among torovirus field variants: evidence for multiple intertypic recombination events." *J Virol* **77**(17): 9567-77.
- Smits, S. L., E. J. Snijder y R. J. de Groot (2006). "Characterization of a torovirus main proteinase." *J Virol* **80**(8): 4157-67.
- Smits, S. L., A. L. van Vliet, K. Segeren, H. el Azzouzi, M. van Essen y R. J. de Groot (2005). "Torovirus non-discontinuous transcription: mutational analysis of a subgenomic mRNA promoter." *J Virol* **79**(13): 8275-81.
- Snijder, E. J., P. J. Bredenbeek, J. C. Dobbe, V. Thiel, J. Ziebuhr, L. L. Poon, Y. Guan, M. Rozanov, W. J. Spaan y A. E. Gorbalenya (2003). "Unique and conserved features of genome and proteome of SARS-coronavirus, an early split-off from the coronavirus group 2 lineage." *J Mol Biol* **331**(5): 991-1004.
- Snijder, E. J., J. A. den Boon, P. J. Bredenbeek, M. C. Horzinek, R. Rijnbrand y W. J. Spaan (1990). "The carboxyl-terminal part of the putative Berne virus polymerase is expressed by ribosomal frameshifting and contains sequence motifs which indicate that toro- and coronaviruses are evolutionarily related." *Nucleic Acids Res* **18**(15): 4535-42.
- Snijder, E. J., J. A. den Boon, M. C. Horzinek and W. J. Spaan (1991). "Characterization of defective interfering RNAs of Berne virus." *J Gen Virol* **72** (Pt 7): 1635-43.
- Snijder, E. J., J. A. Den Boon, W. J. Spaan, M. Weiss y M. C. Horzinek (1990). "Primary structure and post-translational processing of the Berne virus peplomer protein." *Virology* **178**(2): 355-63.
- Snijder, E. J., J. Ederveen, W. J. Spaan, M. Weiss y M. C. Horzinek (1988). "Characterization of Berne virus genomic and messenger RNAs." *J Gen Virol* **69** (Pt 9): 2135-44.

- Snijder, E. J., M. C. Horzinek y W. J. Spaan (1990). "A 3'-coterminally nested set of independently transcribed mRNAs is generated during Berne virus replication." *J Virol* **64**(1): 331-8.
- Snijder, E. J., A. L. Wassenaar, L. C. van Dinten, W. J. Spaan y A. E. Gorbalenya (1996). "The arterivirus nsp4 protease is the prototype of a novel group of chymotrypsin-like enzymes, the 3C-like serine proteases." *J Biol Chem* **271**(9): 4864-71.
- Tsunemitsu, H., M. Kamiyama, K. Kawashima, K. Katsuda, M. Kohmoto, L. J. Saif, T. Shouji y T. Onodera (2005). "Molecular characterization of the major capsid protein VP6 of bovine group B rotavirus and its use in seroepidemiology." *J Gen Virol* **86**(Pt 9): 2569-75.
- Van Kruiningen, H. J., V. P. Castellano, M. Koopmans y L. L. Harris (1992). "A serologic investigation for coronavirus and Breda virus antibody in winter dysentery of dairy cattle in the northeastern United States." *J Vet Diagn Invest* **4**(4): 450-2.
- van Vliet, A. L., S. L. Smits, P. J. Rottier y R. J. de Groot (2002). "Discontinuous and non-discontinuous subgenomic RNA transcription in a nidovirus." *Embo J* **21**(23): 6571-80.
- Vorster, J. H. y G. H. Gerdes (1993). "Breda virus-like particles in calves in South Africa." *J S Afr Vet Assoc* **64**(2): 58.
- Wang, Y., Z. Chang, J. Ouyang, H. Wei, R. Yang, Y. Chao, J. Qu, J. Wang y T. Hung (2005). "Profiles of IgG antibodies to nucleocapsid and spike proteins of the SARS-associated coronavirus in SARS patients." *DNA Cell Biol* **24**(8): 521-7.
- Weiss, M. y M. C. Horzinek (1986). "Morphogenesis of Berne virus (proposed family Toroviridae)." *J Gen Virol* **67** (Pt 7): 1305-14.
- Weiss, M. y M. C. Horzinek (1986). "Resistance of Berne virus to physical and chemical treatment." *Vet Microbiol* **11**(1-2): 41-9.
- Weiss, M., F. Steck y M. C. Horzinek (1983). "Purification and partial characterization of a new enveloped RNA virus (Berne virus)." *J Gen Virol* **64** (Pt 9): 1849-58.
- Weiss, M., F. Steck, R. Kaderli y M. C. Horzinek (1984). "Antibodies to Berne virus in horses and other animals." *Vet Microbiol* **9**(6): 523-31.
- Wilson, I. G. (1997). "Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification." *Appl Environ Microbiol* **63**(10): 3741-51.
- Woode, G. N. (1987). "Breda and Breda-like viruses: diagnosis, pathology and epidemiology." *Ciba Found Symp* **128**: 175-91.
- Woode, G. N., J. F. Pohlenz, N. E. Gourley y J. A. Fagerland (1984). "Astrovirus and Breda virus infections of dome cell epithelium of bovine ileum." *J Clin Microbiol* **19**(5): 623-30.
- Woode, G. N., D. E. Reed, P. L. Runnels, M. A. Herrig y H. T. Hill (1982). "Studies with an unclassified virus isolated from diarrheic calves." *Vet Microbiol* **7**(3): 221-40.
- Woode, G. N., L. J. Saif, M. Quesada, N. J. Winand, J. F. Pohlenz y N. K. Gourley (1985). "Comparative studies on three isolates of Breda virus of calves." *Am J Vet Res* **46**(5): 1003-10.
- Yeager, C. L., R. A. Ashmun, R. K. Williams, C. B. Cardellicchio, L. H. Shapiro, A. T. Look y K. V. Holmes (1992). "Human aminopeptidase N is a receptor for human coronavirus 229E." *Nature* **357**(6377): 420-2.
- Zanoni, R., M. Weiss y E. Peterhans (1986). "The haemagglutinating activity of Berne virus." *J Gen Virol* **67** (Pt 11): 2485-8.
- Zhang, J. S., J. T. Chen, Y. X. Liu, Z. S. Zhang, H. Gao, Y. Liu, X. Wang, Y. Ning, Y. F. Liu, Q. Gao, J. G. Xu, C. Qin, X. P. Dong y W. D. Yin (2005). "A serological survey on neutralizing antibody titer of SARS convalescent sera." *J Med Virol* **77**(2): 147-50.
- Zhang, X., M. Hasoksuz, D. Spiro, R. Halpin, S. Wang, S. Stollar, D. Janies, N. Hadya, Y. Tang, E. Ghedin y L. Saif (2007). "Complete genomic sequences, a key residue in the spike protein and deletions in nonstructural protein 3b of US strains of the virulent and attenuated coronaviruses, transmissible gastroenteritis virus and porcine respiratory coronavirus." *Virology* **358**(2): 424-35.

Ziebuhr, J., E. J. Snijder y A. E. Gorbalenya (2000). "Virus-encoded proteinases and proteolytic processing in the Nidovirales." J Gen Virol **81**(Pt 4): 853-79.

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

ANAE	Ensayo de α -naftil acetato
BEV	Berne Virus
BToV	Torovirus bovino
BS³	Bis(sulfosuccinimidyl)suberato
cDNA	DNA complementario
DMEM	Medio mínimo de Eagle modificado por Dulbecco
DNA	Ácido desoxiribonucleico
dNTPs	Dioxiribonucleotidos trifosfatos
DTT	Dithiotreitol
DTTSP	3,3'-ditiobis(sulfosuccinimidilpropionato)
FCS	Suero fetal de ternera
h.p.i.	Horas post-infección
HToV	Torovirus humano
IH	Título de anticuerpos que inhiben la heomaglutinación
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
NCS	Suero de ternera recién nacida
NEM	N-Etilmaleimida
nt	Nucleótido
ORF	Pauta de lectura abierta
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDD₅₀	Dilución mayor de un suero, que causa una reducción del 50% de las placas de lisis
pNPA	p-nitrofenil acetato
PRCV	Coronavirus respiratorio de cerdo
PRRSV	Virus del síndrome respiratorio reproductivo de cerdo
PToV	Torovirus porcino
RBC	Células rojas sanguíneas o eritrocitos
r.p.m.	Revoluciones por minuto
RNA	Ácido ribonucleico
RNAsg	RNA subgenómico
RT-PCR	Reacción de la transcriptasa reversa y PCR

RT-PCR_{sn}	Reacción de RT-PCR semianidada
SDS	Dodecil sulfato sódico.
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de acrilamida en presencia de SDS
Spf	Suero de cerdo libre de patógenos
TGEV	Virus de la gastroenteritis transmisible de cerdo
u.f.p.	Unidades formadoras de placas
UH	Unidades hemoaglutinantes
WR	Virus vaccinia de la cepa <i>Western reserve</i>

